

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE UM  
BIOGEL ANTIMICROBIANO COM POTENCIAL PARA O CONTROLO DA  
DOENÇA PERIODONTAL CANINA

SANDRA DA SILVA REBELO

ORIENTADOR(A):  
Doutora Maria Manuela Castilho  
Monteiro de Oliveira  
COORDINADOR(A):  
Doutor Luís Miguel Alves Carreira

2020



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE UM  
BIOGEL ANTIMICROBIANO COM POTENCIAL PARA O CONTROLO DA  
DOENÇA PERIODONTAL CANINA

SANDRA DA SILVA REBELO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Berta Maria  
Fernandes Ferreira São Braz

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela  
Castilho Monteiro de Oliveira  
Doutora Lisa Alexandra  
Pereira Mestrinho

ORIENTADOR(A):

Doutora Maria Manuela Castilho  
Monteiro de Oliveira

COORIENTADOR(A):

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Sandra da Silva Rebelo

Título da Tese ou Dissertação: “Desenvolvimento de um modelo *in vitro* para avaliação de um biogel antimicrobiano com potencial para o controlo da doença periodontal canina”

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2020

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☒ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☐ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☒ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☒ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Artigo científico para submissão a revista internacional em fase de avaliação

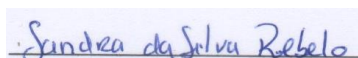
Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 17 de Junho de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:



## **Agradecimentos**

Aos meus pais, sem os quais tudo isto não teria sido possível, por me orientarem na direção certa e acreditarem neste sonho. À restante família, pelo apoio constante.

À professora Manuela, pelo apoio ao longo dos últimos anos, por acreditar em mim e me impulsionar a cumprir todos os meus objetivos. Pela grande amizade, pela paciência e por tudo o que me ensinou. Não podia ter escolhido melhor. May the force be with you!

Ao professor Miguel Carreira, por ter aceitado participar neste projeto e por toda a ajuda e apoio. Pela transmissão de conhecimentos profissionais e para a vida.

À Eva, por todas as energias positivas, pela grande amizade e por me fazer acreditar em mim própria mesmo nos dias maus. Por ser a grande responsável pelo sucesso deste trabalho. Pelo melhor cantinho do gabinete!

À Carla, por me ajudar nos momentos de desespero, pelas tardes de conversa e pela luta pela sobrevivência da Porphy.

À restante família do VETmicroLAB: Miguel, Margarida, Raquel, Ana, Zé, Rui, Sara, Mariana, Cláudia, Catarina, Carolina e Fátima, por serem a melhor equipa e por me terem ajudado a terminar este capítulo da melhor forma.

À Dalila, pelos 14 + n anos e por manter a minha peculiaridade dentro dos limites do DSM. Pela irmandade.

À Kat, por Puscas, pelas sextas nos autocarros noturnos e por continuar a ler as mensagens.

Ao Isidro, por ter aparecido no momento certo, pelos abraços, pelas voltas ao mundo e pela caneca. Por ter ficado.

Aos meus: Gonçalo, pelo C3PO, Sofia, pela Ovibeja e Tânia pela Sandra.

À Psycho por ser a melhor mãe.

À família VETuna, porque as 17h são a melhor hora para começar o dia. Ao 55: Barão, Calimero, Frutas, Madalena, Madeira, Mags, Maria, Rita, Rafa, Sara Silva e Tondi.

To my amazing British family, Filipa, João and Atik, for the best 3 months.

To Dr.Heidi Dalton, for the long afternoons at Hampstead. For sharing the love for Vet Dentistry, for the opportunity to practice and learn from all your expertise and for the friendship.

Aos que não vão ler, mas os mais importantes:

Sassa, Sassa, Jenny, Rita, Kuzco, Loki (the evil one), Loki (the cute one), Paglu, Margot, Feijão, Era, Jolie e Oddie e todos os anónimos que ajudaram nos últimos 6 anos.

## Resumo

### Desenvolvimento de modelos *in vitro* para avaliação de um biogel antimicrobiano com potencial para o controlo da doença periodontal canina

A doença periodontal (DP) é uma das doenças mais frequentes na espécie canina, afetando cerca de 80-85% destes animais. Esta doença, de etiologia multifatorial, inicia-se com o desenvolvimento, na superfície do dente, de placa bacteriana, um biofilme composto maioritariamente por bactérias contidas numa matriz de polissacáridos extracelulares, com o potencial de inibir a ação antimicrobiana e as defesas naturais do hospedeiro. Os processos de agregação bacteriana constituem um fenómeno bastante importante na formação de biofilme ao contribuir para a interação bacteriana durante a evolução da DP.

O principal objetivo do controlo da DP é controlar a formação da placa bacteriana. Estudos realizados com isolados de *Enterococcus faecalis*, obtidos a partir de amostras da cavidade oral canina, demonstraram atividade antimicrobiana de um gel de goma de guar suplementado com nisina (biogel de nisina) contra esta espécie bacteriana, demonstrando a sua potencial eficácia para o controlo da DP canina.

Este estudo teve como objetivos o desenvolvimento de um modelo de biofilme polimicrobiano *in vitro*, que seja representativo da placa bacteriana presente na cavidade oral canina, e a avaliação do potencial inibitório e de erradicação do biogel de nisina relativamente ao biofilme polimicrobiano estabelecido. As espécies bacterianas incluídas foram: *Porphyromonas cangingivalis*, *Neisseria zoodegmatis*, *Corynebacterium canis*, *Peptostreptococcus canis* e *E. faecalis*. Durante a primeira fase deste projeto, foi avaliada a capacidade de agregação entre os cinco isolados bacterianos. Todos os isolados demonstraram capacidade de agregação, revelando o seu potencial para a formação de biofilmes polimicrobianos. De seguida, promoveu-se a formação de um biofilme polimicrobiano constituído pelas cinco espécies bacterianas em estudo. A presença das espécies bacterianas no biofilme estabelecido *in vitro* foi confirmada através da sua observação direta ao microscópio de fluorescência após aplicação da técnica de “Fluorescent *In Situ* Hybridization”. Os resultados da avaliação do potencial inibitório e de erradicação do biogel de nisina revelaram um valor de concentração mínima inibitória de biofilme de 25 µg/mL e um valor de concentração mínima de erradicação de biofilme superior a 100 µg/mL. Ambos os valores correspondem a concentrações de nisina abaixo do limite da dose diária aceitável definida pela Organização Mundial de Saúde, que corresponde a 0 – 2 mg/Kg.

Este estudo demonstrou mais uma vez a eficácia do biogel de nisina para a inibição de biofilmes polimicrobianos confirmando o potencial para a sua utilização no controlo da DP canina.

**Palavras-chave:** biofilme, doença periodontal, gel de goma de guar, nisina.

## Abstract

### Development of an *in vitro* model for the evaluation of an antimicrobial biogel with potential for the control of canine periodontal disease

Periodontal disease (PD) is one of the most common diseases in dogs, affecting around 80 to 85% of the canine population. It refers to a group of conditions caused by the development of a dental plaque in the tooth surface. The dental plaque is characterized by a microbial biofilm formed by a multi-species community of microorganisms enclosed in a self-producing extracellular matrix, which protects bacteria from the host immune system and reduces the action of antimicrobial therapy. It is a well-known fact that aggregation is a specific process that plays an important role in the bacterial interactions during biofilm formation. This process contributes to the changes on bacterial composition of the biofilm during the progression of PD.

Periodontal therapy aims to control the formation of bacterial plaque. Previous studies have demonstrated that, when incorporated within a guar-gum biogel (nisin-biogel), antimicrobial peptide nisin can inhibit and eradicate mono-species biofilms formed by canine oral enterococci, rendering it a potential agent for PD control.

The main objectives of this project were to establish a five-species biofilm model aiming to simulate dental biofilms from dogs with PD and to use the established model to evaluate the inhibitory potential of the nisin-biogel, previously developed by our research team. The bacterial species included were: *Porphyromonas cangingivalis*, *Neisseria zoodegmatis*, *Corynebacterium canis*, *Peptostreptococcus canis* and *Enterococcus faecalis*.

During the first task, aggregation rates between all the isolates were calculated two by two and individually. All the isolates showed aggregation ability after either a 2h or 24h incubation, showing their potential to form multi-species biofilms. Later, a five-species biofilm model was successfully established and the presence of the five bacterial species was confirmed by Fluorescent *In Situ* Hybridization using specific probes. The susceptibility of the multi-species biofilm to the nisin-biogel was evaluated by determination of the Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) and of the Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC). The nisin-biogel presented inhibitory activity against the polymicrobial biofilm, with a MBIC value of 25 µg/mL and a MBEC value > 100 µg/mL, both corresponding to nisin dosages lower than the acceptable daily intake, 0 – 2 mg/Kg, set by the World Health Organization.

This study demonstrated that the nisin-biogel developed by our research team can inhibit the formation of multi-species biofilms, reinforcing its potential to control canine PD.

**Keywords:** biofilm, guar gum gel, nisin, periodontal disease.

## Índice geral

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Índice geral.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Anexos.....	ix
Lista de Abreviaturas .....	ix
PARTE 1 - RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
PARTE 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. DOENÇA PERIODONTAL.....	4
1.1. Características da cavidade oral canina .....	4
1.2. Etiologia da doença periodontal .....	6
1.3. Sinais clínicos .....	7
1.4. Diagnóstico .....	8
1.4.1. Exame físico geral.....	8
1.4.2. Exame oral com o animal anestesiado.....	9
1.5. Estadiamento.....	10
1.6. Tratamento médico e cirúrgico.....	13
2. MICROBIOTA PERIODONTAL .....	15
2.1. Microbiota oral canina .....	15
2.2. Fases de desenvolvimento da DP .....	16
2.3. <i>Neisseria zoodegmatis</i> .....	19
2.4. <i>Corynebacterium canis</i> .....	20
2.5. <i>Porphyromonas cangingivalis</i> .....	20
2.6. <i>Peptostreptococcus canis</i> .....	22
2.7. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	22
2.8. Importância dos modelos <i>in vitro</i> em microbiologia clínica .....	23
3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS E PREVENÇÃO .....	24
3.1. Outras formas de prevenção da doença periodontal .....	24
3.2. Nisina .....	25
3.2.1. Características gerais .....	25
3.2.2. Mecanismos de ação .....	26
3.2.3. Resistência à nisina .....	27
3.2.4. Aplicações da nisina na doença periodontal .....	28



3.3. Biogel antimicrobiano .....	29
PARTE III – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	30
1. Objetivos e fases experimentais.....	30
2. Materiais e métodos.....	30
2.1. Isolados bacterianos.....	30
2.2. Biogel antimicrobiano: nisina-biogel.....	33
2.3. Avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação bacteriana ...	33
2.4. Estabelecimento de um modelo <i>in vitro</i> de biofilme polimicrobiano.....	35
2.5. Caracterização do biofilme polimicrobiano pela técnica Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization (FISH) .....	37
2.6. Avaliação do potencial antimicrobiano do biogel de nisina relativamente a um biofilme polimicrobiano - determinação da concentração mínima inibitória (CMIB) e de erradicação (CMEB) de biofilme .....	40
3. Resultados e discussão .....	41
3.1. Avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação bacteriana ...	42
3.2. Caracterização do biofilme polimicrobiano pela técnica Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization (FISH) .....	46
3.3. Avaliação do potencial antimicrobiano do biogel de nisina relativamente a um biofilme polimicrobiano - determinação da concentração mínima inibitória (CMIB) e de erradicação (CMEB) de biofilme .....	50
4. Conclusões .....	53
5. Limitações do estudo .....	54
6. Perspetivas futuras .....	54
Bibliografia.....	56
Anexos.....	65

## Índice de Figuras

Figura 1 - Observação de <i>Peptostreptococcus canis</i> ao microscópio após coloração por método gram .....	1
Figura 2 - Avaliação do tipo respiratório das espécies <i>Enterococcus faecalis</i> (E, em cima) e <i>Neisseria zoodegmatis</i> (N, em baixo), por método oxidase.....	1
Figura 3 - Avaliação morfológica da espécie <i>Corynebacterium canis</i> em sementeira por estria em meio de cultura Chocolate agar.....	2
Figura 4 - Corte sagital de um dente .....	5
Figura 5 - Corte transversal da mucosa gengival de um dente canino .....	6
Figura 6 - Representação das diferentes fases de desenvolvimento da DP canina .....	11
Figura 7 - Descrição das alterações radiográfica presentes nas diferentes fases da DP canina .....	12
Figura 8 - Fases de formação do biofilme .....	18
Figura 9 - Molécula de nisina.....	26
Figura 10 - Mecanismos de ação: ligação ao lípido II .....	27
Figura 11 - Caracterização morfológica de <i>N. zoodegmatis</i> em meio de enriquecimento BHI agar.....	31
Figura 12 - Caracterização morfológica de <i>P. canis</i> em meio de enriquecimento Chocolate agar.....	32
Figura 13 - Caracterização morfológica de <i>C. canis</i> em meio de enriquecimento COS.....	32
Figura 14 - Caracterização morfológica de <i>P. cangingivalis</i> em meio de enriquecimento Caldo de Brucella.....	32
Figura 15 - Esquema ilustrativo da escala de avaliação visual da capacidade de agregação bacteriana.....	34
Figura 16 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços .....	36
Figura 17 - Soluções stock de cada uma das cinco sondas utilizadas para cada espécie bacteriana alvo .....	38
Figura 18 - Distribuição das diferentes suspensões individuais bacterianas nos poços de lâminas de teflon, para confirmação da especificidade de cada uma das sondas selecionadas .....	39
Figura 19 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços .....	40
Figura 20 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CMIB e CMEB da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina.....	41
Figura 21 - Visualização de <i>N. zoodegmatis</i> (setas a amarelo) presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella.....	46

Figura 22 - Visualização de <i>C. canis</i> presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella .....	47
Figura 23 - Visualização de <i>E. faecalis</i> presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella .....	47
Figura 24 - Visualização de <i>P. canis</i> presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella .....	47
Figura 25 - Visualização de <i>P. cangingivalis</i> presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella .....	48
Figura 26 - Determinação da CMIB .....	52
Figura 27 - Determinação da CMEB.....	52

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Índices de classificação dos diversos parâmetros utilizados durante a avaliação da cavidade oral canina .....	10
Tabela 2 - Fases de desenvolvimento da DP canina.....	11
Tabela 3 – Descrição das características das sondas utilizadas para cada espécie bacteriana alvo .....	38
Tabela 4 - Avaliação do potencial de co-agregação bacteriana entre os 17 isolados de <i>E. faecalis</i> e as estirpes aeróbias <i>N. zoodegmatis</i> e <i>C. canis</i> , por avaliação visual e espectrofotométrica.....	43
Tabela 5 - Avaliação do potencial de auto-agregação e co-agregação entre todas as espécies bacterianas envolvidas no projeto por avaliação visual e espectrofotométrica.....	45

## Índice de Anexos

Anexo 1 - Resumo do poster: “A five-species biofilm model for confirming the potencial of a nisin-biogel aiming at canine periodontal disease control”.....	65
---	----

## Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

® - Marca registrada

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  - Beta

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrómetro

AB – Antibiótico

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico  
**AINE** - Anti-inflamatório não esteroide  
**ATP** - Adenosina trifosfato  
**BHI** – “Brain Heart Infusion”  
**CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O** - Cloreto de cálcio dihidratado  
**CMEB** – Concentração mínima de erradicação de biofilme  
**CMIB** - Concentração mínima inibitória de biofilme  
**COS** – “Columbia Blood Agar”  
**DDA** - Dose Diária Aceitável  
**DGAV** - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária  
**DP** – Doença periodontal  
**EMA** – “European Medicines Agency”  
**FAO** - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura  
**FISH** – “Fluorescent *In Situ* Hybridization”  
**g** - Grama  
**h** - Hora  
**HCl** - Ácido Clorídrico  
**Hz** - Hertz  
**IU** – Unidades internacionais  
**Kg** - Kilograma  
**M** - Molar  
**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de magnésio  
**mL** - Mililitro  
**mm** – Milímetros  
**MV** – Médico Veterinário  
**NaCl** - Cloreto de sódio  
**NaN<sub>3</sub>** – Azoteto de sódio  
**nm** – Nanômetros  
**NSR** – “Nisin resistance protein”  
**OD** – “Optical density”  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**p.v.** - Peso vivo  
**PBS** – “Phosphate-buffered saline”  
**rARN** - Ácido ribonucleico ribossomal  
**SAC** – Saliva artificial canina  
**TSB** – “Tryptic soy broth”  
**UFC** – Unidade formadora de colônia

## PARTE 1 - RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio final de curso foi realizado no período de 28 de janeiro a 19 de dezembro de 2019 no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa). Durante este tempo foi desenvolvido um trabalho prático inserido num projeto de investigação cujo objetivo é a avaliação da eficácia de um biogel de goma de guar, utilizado como veículo de administração de um péptido antimicrobiano, a nisina, na prevenção da doença periodontal canina. As tarefas desenvolvidas neste estágio resultaram na realização da presente dissertação de mestrado.

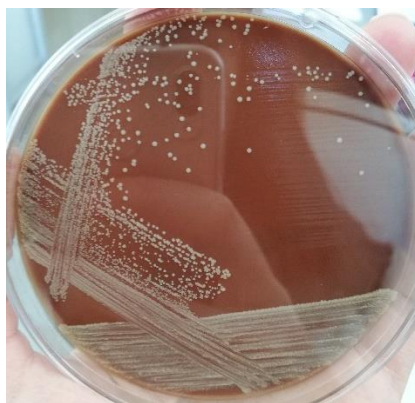
Nas primeiras semanas de estágio foi realizada uma pesquisa bibliográfica que permitiu o estabelecimento dos protocolos experimentais a realizar durante o estágio. Ao mesmo tempo, foram executadas técnicas básicas de laboratório, incluindo o manuseamento de estirpes bacteriológicas aeróbias e anaeróbias, coloração por método gram e caracterização morfológica, avaliação do tipo respiratório por métodos oxidase e catalase, preparação de meios de cultura e soluções e preparação de material para esterilização, bem como regras de assepsia e proteção pessoal (figuras 1, 2 e 3).



Figura 1 - Observação de *Peptostreptococcus canis* ao microscópio após coloração por método gram (original do autor)



Figura 2 - Avaliação do tipo respiratório das espécies *Enterococcus faecalis* (E, em cima) e *Neisseria zoodegmatis* (N, em baixo), por método oxidase (original do autor)



**Figura 3 - Avaliação morfológica da espécie *Corynebacterium canis* em sementeira por estria em meio de cultura Chocolate agar (original do autor)**

Após a fase de pesquisa, foram desenvolvidas técnicas diretamente relacionadas com o trabalho prático conducente a esta dissertação, tais como avaliação da auto-agregação e co-agregação bacteriana por determinação da densidade ótica (“Optical density” - OD), estabelecimento de biofilmes polimicrobianos, aplicação da técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente (“Fluorescent *In Situ* Hybridization” - FISH) e determinação da concentração mínima inibitória e de erradicação de biofilmes polimicrobianos.

Este estágio permitiu também a participação em algumas fases de estudo de um projeto de doutoramento desenvolvido pela Dra. Eva Cunha no Laboratório de Bacteriologia, intitulado “Periodontal disease in dogs: an experimental approach towards prevention using antimicrobial peptides”, possibilitando uma abordagem mais extensa ao tema da DP canina e o contacto com diversas técnicas diferentes das utilizadas neste projeto.

Durante todo este tempo foram realizadas reuniões periódicas com todo o grupo de investigação associado ao laboratório de bacteriologia, onde eram apresentados os resultados obtidos e discutidas estratégias de trabalho para o futuro. Diariamente era reconhecível um grande espírito de camaradagem entre todos os membros do laboratório, sendo fomentada a troca de ideias, dúvidas e resolução de problemas inesperados, tendo estes meses de estágio resultado numa experiência bastante enriquecedora a nível profissional e pessoal.

A investigação desenvolvida possibilitou a elaboração de um trabalho, a ser exposto no “30th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Disease” (ECCMID 2020), com o título “A five-species biofilm model for confirming the potential of a nisin-biogel aiming at canine periodontal disease control” e a decorrer entre os dias 18 e 21 de abril de 2020 em Paris (França) (anexo 1)

Parte desta investigação foi também apresentada sob a forma de um Projeto CIISA MSc 2019, intitulado “Development of an *in vitro* polymicrobial biofilm model for the evaluation

of nisin-biogel aiming at canine periodontal disease control” e cujo relatório final foi entregue no dia 30 de dezembro de 2019.

Os objetivos futuros passam pela participação em diversos congressos conhecidos da área, como é o caso do “Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários”, entre outros que surjam quer a nível nacional como internacional, assim como a elaboração de um artigo científico para publicação numa revista internacional de referência.

## **PARTE 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. DOENÇA PERIODONTAL**

#### **1.1. Características da cavidade oral canina**

Para uma melhor compreensão da DP é necessário conhecer a anatomia e fisiologia da cavidade oral canina.

A espécie canina possui 28 dentes decíduos e 42 dentes permanentes (Lemmons and Beebe 2019). Cada dente pode ser dividido em duas regiões: a coroa clínica, que se projeta acima da gengiva, e a raiz que pode ser única ou múltipla e que se encontra inserida no alvéolo. Em termos histológicos, os dentes são constituídos por quatro tecidos: esmalte, cemento, dentina e polpa dentária. A cavidade pulpar pode ser dividida em câmara pulpar e canal radicular. Este último estende-se até ao forâmen apical, onde ocorre a entrada e saída de vasos sanguíneos e feixes nervosos da polpa. Estes feixes nervosos são os únicos constituintes do dente com sensibilidade à dor, prolongando-se pelos túbulos dentinários e tornando a dentina sensível a diversos estímulos como temperatura, trauma e pH ácido (Junqueira and Carneiro 2013; Lemmons and Beebe 2019) (figura 1).

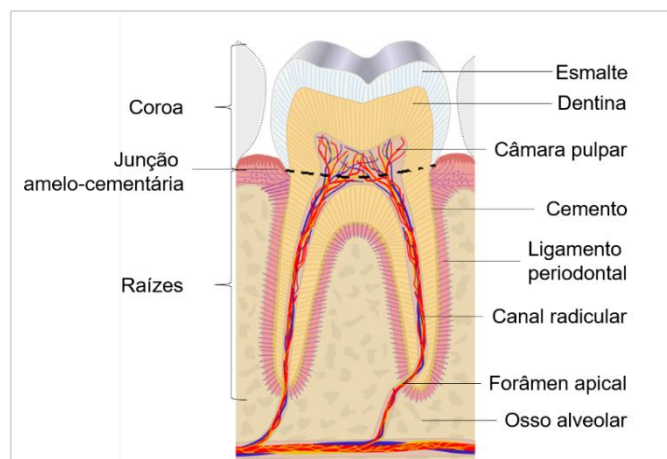
A dentina é o tecido mineralizado que ocupa a maior proporção do dente. A sua matriz orgânica é excretada pelos odontoblastos presentes na periferia da polpa (Junqueira and Carneiro 2013; Lemmons and Beebe 2019).

O esmalte é o componente mais duro do corpo humano, com aproximadamente 3% de percentagem de água. Este constituinte recobre a coroa, sendo formado pelos prismas do esmalte, unidos entre si pelo esmalte interprismático, ambos compostos por cristais de hidroxiapatite (Junqueira and Carneiro 2013; Fiorellini et al. 2018; Lemmons and Beebe 2019)

A ligação do dente ao alvéolo ocorre através do ligamento periodontal, tecido conjuntivo cujas grossas fibras de colagénio (fibras de Sharpey) se inserem no cemento e no osso alveolar, fixando o dente ao mesmo tempo que permitem uma certa flexibilidade de movimentos. O ligamento periodontal é também responsável por evitar a transmissão da pressão exercida nos dentes diretamente ao osso, e assim contribuir para que não ocorra reabsorção óssea (Junqueira and Carneiro 2013; Fiorellini et al. 2018).

O periodonto é formado por um o conjunto de quatro estruturas: o cemento, o ligamento periodontal, o osso alveolar e a gengiva, responsáveis por manter o dente inserido de forma estável na mandíbula e maxila. O cemento é um tecido avascular mineralizado presente no dente e no periodonto (Junqueira and Carneiro 2013; Fiorellini et al. 2018; Lemmons and Beebe 2019). O ponto de união entre o cemento radicular e o esmalte da coroa denomina-se por junção amelo-cementária (Bellows 2004; Fiorellini et al. 2018) (figura 4).



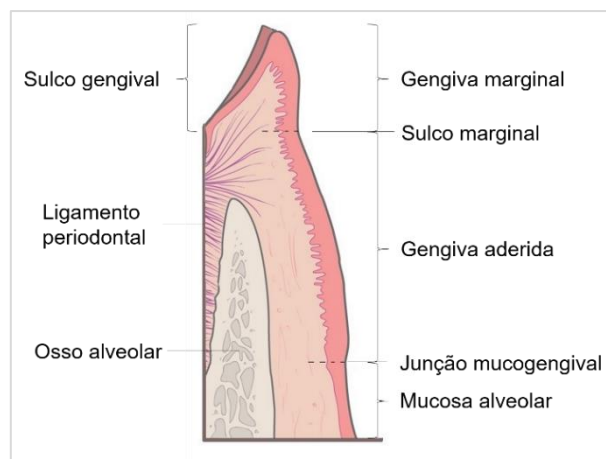


**Figura 4 - Corte sagital de um dente (imagem autorizada para utilização não comercial)**

A cavidade oral é constituída por epitélio pavimentoso estratificado. Em algumas zonas, como é o caso da gengiva aderida, este epitélio é queratinizado, permitindo a proteção da mucosa das agressões mecânicas provocadas pela mastigação (Bellows 2004; Junqueira and Carneiro 2013). A mucosa alveolar encontra-se separada da mucosa gengival pela junção mucogengival (Lemmons and Beebe 2019).

A gengiva aderida cobre os processos alveolares em volta do dente e está fortemente ligada ao osso alveolar, sendo formada por epitélio queratinizado classificado como epitélio oral. Apicalmente e separada pelo sulco marginal, encontra-se a gengiva marginal, porção gengival não ligada ao dente constituída por epitélio queratinizado na sua face livre. Entre a gengiva marginal e o dente encontra-se o sulco gengival, com 1-3mm de profundidade. O epitélio que recobre a face dentária da gengiva marginal é não queratinizado, sendo classificado como epitélio sulcular. O terceiro tipo de epitélio, classificado como epitélio juncional, está presente no sulco gengival, que se liga ao cemento na zona imediatamente apical à junção amelo-cementária, separando o ligamento periodontal da cavidade oral (Bellows 2004; Fiorellini et al. 2018) (figura 5).

Dentro do sulco gengival encontra-se o fluido gengival crevicular, um exsudado inflamatório constituído por soro e compostos produzidos localmente. Estes podem ser produtos resultantes da degradação de tecidos, mediadores inflamatórios ou anticorpos contra a formação de placa dentária. A quantidade de fluido gengival crevicular presente na gengiva saudável é muito reduzida. Em casos de inflamação, a quantidade de fluido produzido aumenta, assim como a percentagem de compostos anti-inflamatórios nele presentes, contribuindo para a lavagem do sulco e redução da carga bacteriana (Subbarao et al. 2019).



**Figura 5 - Corte transversal da mucosa gengival de um dente canino (original do autor)**

Um outro fluido também presente na cavidade oral, mas produzido por glândulas específicas, é a saliva. As principais glândulas produtoras deste composto são as glândulas parótidas, mandibulares, sublinguais e zigomáticas. A saliva é um fluido seroso e mucoso, composto por uma mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas como eletrólitos, proteínas, hormonas, minerais, compostos bactericidas, vitaminas e uma pequena quantidade de enzimas, como a amilase. As suas funções incluem a manutenção da camada húmida protetora da mucosa e dentes, lavagem e limpeza da cavidade oral, equilíbrio do pH oral, ação antimicrobiana e remineralização dentária (Lemmons and Beebe 2019).

## **1.2. Etiologia da doença periodontal**

A DP é uma das doenças mais frequentes na espécie canina, estimando-se que cerca de 80-85% dos indivíduos desta espécie venham a desenvolver a doença nos primeiros 2 a 3 anos de vida (Stepaniuk 2019). Esta doença tem como causa primária a reação inflamatória secundária a deposição de placa bacteriana nos dentes, existindo, no entanto, diversos fatores de origem local ou sistémica que podem contribuir para o aumento da deposição de placa e/ou diminuição das defesas locais. (Albuquerque et al. 2012; Stepaniuk 2019).

A DP pode estar presente em indivíduos de todas as raças da espécie canina, sendo, no entanto, mais prevalente em animais pertencentes a raças pequenas ou miniatura, assim como em raças braquicefálicas. Esta tendência deve-se à maior longevidade das raças mais pequenas, aumentando assim o tempo disponível para o desenvolvimento da doença, e à diminuição não proporcional do tamanho da mandíbula e maxila em relação ao tamanho dos dentes. Além disso, as raças pequenas e braquicefálicas apresentam também uma tendência para a ocorrência de maloclusão, como o apinhamento dentário, o que diminui a eficácia dos processos intrínsecos de limpeza dentária, levando a uma maior acumulação de placa dentária (Bellows 2004; Albuquerque et al. 2012; Kačirová et al. 2019).

O estado imunitário do animal é também considerado um fator importante no desenvolvimento de doenças, incluindo a doença periodontal (Niemiec 2011; Albuquerque et al. 2012). Doenças imunomediadas, diabetes *mellitus*, administração de fármacos imunossupressores e ocorrência de anemia, leucopenia ou neutropenia levam a uma alteração na resposta imunitária do organismo e maior predisposição para a evolução desta doença (Soukup 2010; Albuquerque et al. 2012; Stepaniuk 2019). Animais sujeitos a radioterapia podem desenvolver lesões de vasculite que contribuem para a destruição do periodonto, podendo ainda sofrer lesões irreversíveis de xerostomia. Esta é caracterizada por uma diminuição da proporção de saliva presente na cavidade oral e, como tal, diminuição da presença de fatores antimicrobianos, anticorpos e antiproteases, que ajudam no controlo do desenvolvimento da placa dentária (Soukup 2010). Animais com lesões dermatológicas podem desenvolver hábitos de morder ou mastigar excessivamente algumas áreas do corpo, levando a um desgaste adicional dos dentes e acumulação de pelos e outros detritos, que provocam reação inflamatória e consequentemente gengivite e periodontite (Stepaniuk 2019).

O desenvolvimento da DP também se encontra associada a outros fatores diretamente relacionados com o manejo dos animais por parte dos cuidadores e Médicos Veterinários (MV). Procedimentos odontológicos inadequados, que provoquem lesões nos tecidos ou alteração no equilíbrio da microbiota do sulco gengival, podem promover a multiplicação de organismos anaeróbios ou prejudicar a eficácia da rotina dentária realizada pelos cuidadores (Soukup 2010; Polkowska et al. 2014). Cuidados dentários diários ineficientes tais como alimentação com dietas pobres em Vitamina C e selênio, responsáveis pelo aumento da resistência do ligamento periodontal, disponibilização de brinquedos com elevada dureza, que podem levar a fraturas dentárias, ausência de escovagem manual dos dentes com escovas próprias para o efeito e ausência de limpezas dentárias de rotina efetuadas pelo MV contribuem para falhas na prevenção da DP e uma maior taxa de animais em fases avançadas da doença (Stepaniuk 2019).

### **1.3. Sinais clínicos**

Os sinais clínicos inicialmente associados à DP são, na grande maioria das vezes, silenciosos ou não específicos. Isto faz com que esta doença possa ser mais difícil de detetar por parte dos cuidadores ou de diagnosticar por MV menos experientes (Stepaniuk 2019).

A gengivite é a primeira fase de desenvolvimento da DP, sendo a única que pode ser reversível quando tratada de forma adequada, já que não envolve perda de estruturas de suporte do dente (Soukup 2010; Niemiec 2011; McFadden and Marretta 2013; Carreira et al. 2015). Os sinais clínicos de gengivite incluem eritema das gengivas, edema, hemorragia das margens e halitose. Quando permanece sem tratamento, a gengivite pode evoluir para periodontite, cujo principal sinal clínico é a halitose, o aumento da mobilidade dentária devido

a destruição do ligamento periodontal e por perda do osso alveolar (Gorrel 2004a; Niemiec 2011; Carreira et al. 2015). Outros sinais de periodontite incluem a recessão das gengivas, aumento do sulco gengival e formação de bolsas periodontais e exposição das raízes e furcas dentárias (McFadden and Marretta 2013). Outros sinais clínicos observados tais como relutância em mastigar, aversão ao toque na zona da cabeça, queda de alimentos durante a mastigação, movimentos exagerados da mandíbula durante a alimentação e aversão a comida e água encontram-se associados à presença de dor (Stepaniuk 2019).

#### **1.4. Diagnóstico**

A avaliação da saúde oral e do periodonto, pelo MV é uma etapa muito importante nas consultas de rotina (Bellows 2019; Stepaniuk 2019). Uma gengiva saudável apresenta uma cor rosa coral e a sua porção marginal é fina e com textura regular e macia. Adicionalmente, não devem ser visíveis sinais de placa ou cálculo dentário (Niemiec 2011; Albuquerque et al. 2012). Quanto às características radiográficas, a dentina, o esmalte e a lamina dura são radiopacas e a polpa dentária e o ligamento periodontal apresentam uma radiopacidade de tecido mole. Em cães de idade mais avançada é normal notar uma diminuição da cavidade pulpar (Forrest 2013).

Existem 7 passos fulcrais a seguir durante qualquer exame oral: a recolha de história pregressa, o exame de estado geral, o exame físico facial, a observação da cavidade oral, o exame oral pré anestésico, o exame oral em anestesia e, finalmente, a realização de exames complementares de diagnóstico (Bellows 2019).

##### **1.4.1. Exame físico geral**

O diagnóstico da DP pode ser dividido em duas fases: exame físico com o animal consciente e exame físico com o animal anestesiado. Durante estas fases, a utilização de formulários pré-concebidos para o registo de alterações observadas durante o exame oral é uma forma de reunir toda a informação necessária ao diagnóstico (Bellows et al. 2019)

A primeira fase do diagnóstico inicia-se na sala de consulta, na presença do cuidador. Devem ser recolhidas informações acerca da higiene oral do animal, dieta, ambiente onde vive, brinquedos disponibilizados, administração regular de medicação, doenças prévias ou episódios anestésicos, mudanças de comportamento e respetivo início e frequência (Stepaniuk 2019).

De seguida, deve ser realizado um exame de estado geral do paciente, com especial atenção para a zona da cabeça e cavidade oral. A estrutura do esqueleto maxilo-facial deve ser observada e palpada, para avaliação da sua simetria, extensão, ocorrência dor ou dificuldade em abertura e encerramento da articulação temporo-mandibular e tipo de oclusão

dentária. Os globos oculares devem ser examinados através de movimentos de retropulsão para detecção de dor ou resistência e os linfonodos regionais e as glândulas salivares devem ser palpados para avaliação da sua dimensão. Quanto à cavidade oral, o exame deve ser iniciado pela observação dos lábios e junção mucocutânea para detecção de alterações físicas, halitose ou sialorreia. Finalmente, os dentes devem ser contados e devem ser avaliados quanto à sua cor, posição, presença de dentes decíduos, exposição de raízes dentárias ou furca, placa e cálculos dentários. A mucosa gengival deve ser avaliada quanto à presença de lesões, massas, inflamação e hemorragia (Bellows et al. 2019; Stepaniuk 2019).

No caso de doentes com sinais clínicos e/ou problemas confirmados em outros sistemas que não a cavidade oral, estes devem, sempre que possível, ser tratados ou estabilizados de forma a permitir a realização de um protocolo anestésico em segurança, de modo a permitir que o MV prossiga para a segunda fase do exame oral (Bellows et al. 2019).

#### **1.4.2. Exame oral com o animal anestesiado**

Apesar da avaliação consciente nos fornecer informações essenciais quanto ao estado geral do animal e comportamentos observados pelo cuidador, é apenas durante o exame com o animal anestesiado que é possível a detecção da doença a nível subgengival e seu estadiamento. Esta fase do exame é realizada com o auxílio de uma sonda exploratória, um instrumento odontológico com duas extremidades: uma pontiaguda e uma retilínea milimetrada (Stepaniuk 2019). Durante a avaliação sob anestesia existem 6 parâmetros que devem ser investigados para cada dente: presença de gengivite, profundidade do sulco gengival, recessão gengival, exposição da furca, mobilidade dentária e estado de preservação do ligamento periodontal (Gorrel 2004b). De forma a obter uma avaliação mais coerente pelos MV foram criados alguns índices de classificação destes parâmetros (tabela 1).

A avaliação da presença de gengivite pode ser feita através da observação da alteração da cor das gengivas para vermelho escuro, presença de edema e ocorrência de hemorragia após avaliação do sulco gengival pela sonda exploratória. A profundidade do sulco gengival é definida como a distância entre a extremidade da gengiva marginal e a base do sulco. Num animal saudável este deve ter entre 1-3mm de profundidade e pode aumentar no caso de edema das gengivas ou destruição do ligamento periodontal. O índice de recessão gengival pode ser determinado através da medição da distância entre a extremidade da gengiva marginal e a junção amelo-cementária. O estado de preservação do ligamento periodontal pode ser avaliado através da junção destes dois últimos parâmetros ou da medição da distância entre a junção amelo-cementária e a base do sulco gengival. A exposição da furca ocorre quando existe destruição do osso alveolar presente entre as raízes dos dentes com mais de uma raiz e pode ser avaliada com a ajuda da extremidade pontiaguda da sonda exploratória (Gorrel 2004b).

**Tabela 1 - Índices de classificação dos diversos parâmetros utilizados durante a avaliação da cavidade oral canina**

<b>Inflamação gengival <sup>(a)</sup></b>	
<b>Fase 1 (g1)</b>	Gengivite fraca. Ligeira alteração de cor e edema das gengivas. Sem ocorrência de hemorragia após exame com sonda.
<b>Fase 2 (g2)</b>	Gengivite moderada. A extremidade da gengiva apresenta cor vermelha e edema. Ocorrência de hemorragia após exames com sonda.
<b>Fase 3 (g3)</b>	Gengivite grave. A extremidade da gengiva apresenta cor vermelha ou vermelha-azulada, presença de edema grave. Ocorrência de hemorragia espontânea e/ou úlceras na extremidade da gengiva.
<b>Exposição da furca <sup>(b)</sup></b>	
<b>Fase 1 (f1):</b>	A sonda exploratória avança no sulco gengival em várias direções, sem ultrapassar o limite da coroa e sem perda de ligação do dente.
<b>Fase 2 (f2):</b>	A sonda exploratória avança no sulco gengival para além da coroa, com alguma perda de ligação do dente
<b>Fase 3 (f3):</b>	A sonda exploratória atinge as raízes do dente e consegue atravessar a furca.
<b>Mobilidade dentária <sup>(b)</sup></b>	
<b>Fase 0 (m0):</b>	Mobilidade fisiológica menor que 0,2mm.
<b>Fase 1 (m1):</b>	Mobilidade aumentada em todas as direções exceto a axial entre 0,2-0,5mm
<b>Fase 2 (m2):</b>	Mobilidade aumentada em todas as direções exceto a axial entre 0,5-1mm
<b>Fase 3 (m3):</b>	Mobilidade aumentada em todas as direções exceto a axial superior a 1mm ou ocorrência de movimentos axiais.
<b>(a)</b> - (Gorrel 2004b)	
<b>(b)</b> - (American Veterinary Dental College 1988)	

A avaliação radiográfica completa da cavidade oral – *status* radiográfico do doente, é um passo necessário antes da decisão sobre qualquer tratamento a aplicar. Este processo tem como objetivo a avaliação da destruição do osso alveolar e, mais tarde, da evolução do tratamento aplicado (Gorrel 2004a). Os sinais observados na avaliação radiográfica de animais com DP indicam destruição do osso alveolar marginal, aumento da largura do ligamento periodontal, diminuição da radiopacidade ou destruição da lamina dura e destruição de osso alveolar, originando sulcos infra ou supra ósseos (Albuquerque et al. 2012; Forrest 2013).

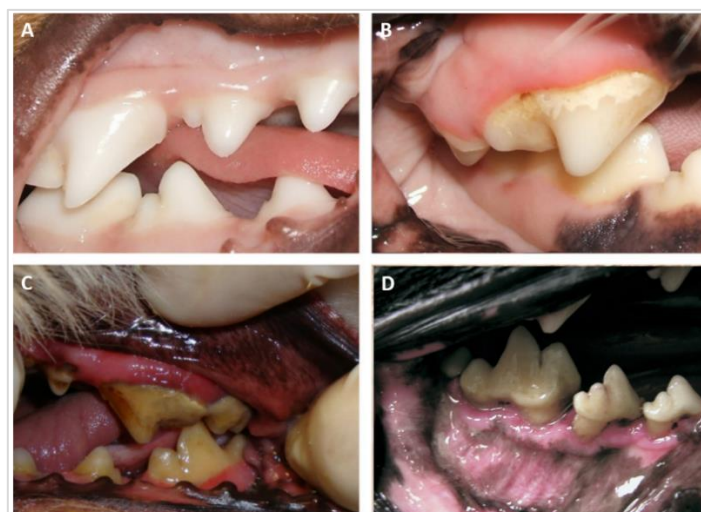
### **1.5. Estadiamento**

Durante o estadiamento da DP, é importante ter em consideração que é possível encontrar diferentes fases de desenvolvimento desta doença no mesmo animal ou diferentes níveis de envolvimento dos vários constituintes do mesmo dente (Stepaniuk 2019). O doente deve ser diagnosticado de acordo com os resultados da avaliação do dente em estado mais

avançado da doença (Bellows 2004). Segundo o Colégio Americano de Dentistria Veterinária (American Veterinary Dental College), a DP pode ser dividida em 4 fases (American Veterinary Dental College 1988), descritas na tabela 2 e figuras 6 e 7.

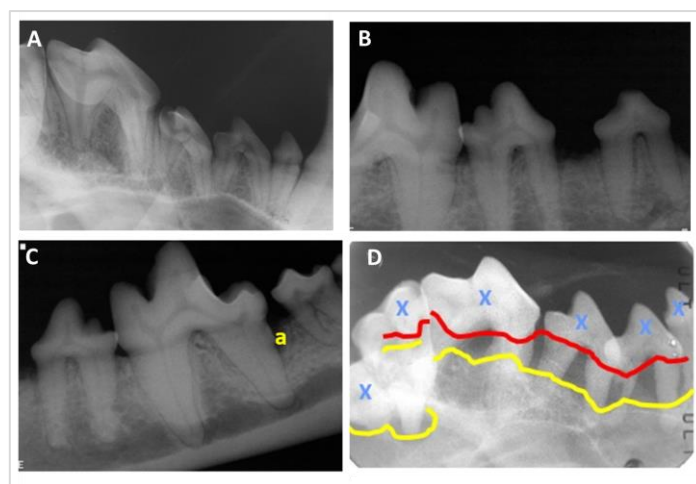
**Tabela 2 - Fases de desenvolvimento da DP canina**

<b>Normal (PD0)</b>	Sem evidências clínicas de presença de inflamação gengival ou periodontite.
<b>Fase 1 (PD1)</b>	Presença de gengivite, sem evidência de destruição do ligamento periodontal. Margens gengivais sem alterações.
<b>Fase 2 (PD2)</b>	Ligeira periodontite. Índice de exposição da furca em fase F1. Presença de ligeiros sinais radiológicos de periodontite. Destruição ligeira do ligamento periodontal (menos de 25%), evidenciado por exame com sonda exploratória e exame radiográfico.
<b>Fase 3 (PD3)</b>	Periodontite moderada. Índice de exposição da furca em fase F2. Destruição moderada do ligamento periodontal (entre 25-50%) evidenciado por exame com sonda exploratória e exame radiográfico.
<b>Fase 4 (PD4)</b>	Periodontite em estado avançado. Índice de exposição da furca em fase F3. Destruição avançada do ligamento periodontal (mais de 50%), evidenciado por exame com sonda exploratória e exame radiográfico.



**Figura 6 - Representação das diferentes fases de desenvolvimento da DP canina**

Legenda: A – PD0 sem evidência clínica de gengivite ou periodontite; B – Pré-molar maxilar em PD1 com evidência de ligeira gengivite e deposição de cálculo; C – Pré-molar em PD3 com inflamação e edema gengival e elevada deposição de cálculo dentário; (A, B e C gentilmente cedidas por: Albuquerque et al. 2012) D – PD4 com índice de exposição de furca em fase F3 (adaptado de: American Veterinary Dental College 2019).



**Figura 7 - Descrição das alterações radiográfica presentes nas diferentes fases da DP canina**

Legenda: A – PD1 sem alterações radiográficas ; B – PD2 com perda de mineralização óssea evidenciada pela aparência irregular do osso alveolar; C – PD3 com destruição de osso alveolar (a); D – PD4 com destruição avançada do ligamento periodontal. A linha amarela representa o limite do osso alveolar, comparativamente ao que deveria ser o seu limite normal, representado pela linha vermelha. Os “x” representam os dentes propostos para extração (Imagens adaptadas de: American Veterinary Dental College 2019).

Em casos de estado avançado de doença, e principalmente quando não existe um acompanhamento médico adequado, podem surgir alterações em outros sistemas orgânicos, estejam eles próximos ou não da cavidade oral.

Um dos problemas que pode surgir em casos de progressão da doença até à superfície do palato é a formação de fístulas oro nasais, originando sinusites. Estas são associadas principalmente aos dentes maxilares caninos. Os sinais clínicos detetados envolvem espirros e corrimento nasal limpo ou mucoso e, por vezes, hemorrágico. Podem também ocorrer abscessos peri-endodônticos, ou de classe II. Estes ocorrem principalmente em dentes de raízes múltiplas e têm por base uma infecção endodôntica, que se propaga por toda a cavidade pulpar. Outra das consequências de periodontite avançada é a ocorrência de fraturas da mandíbula, principalmente na região dos caninos e primeiros molares. Estas fraturas são causadas pela perda progressiva do ligamento periodontal e consequente enfraquecimento do osso mandibular e podem ocorrer durante procedimentos odontológicos ou, em caso muito graves, quando o animal se alimenta (Niemieć 2011).

A nível sistémico, a DP pode atuar através de 3 mecanismos: 1) propagação direta de microrganismos patogénicos, 2) disseminação de endotoxinas bacterianas através do epitélio sulcular para a corrente sanguínea e 3) produção de mediadores inflamatórios sistémicos (Stepaniuk 2019). Estes mecanismos podem provocar o desenvolvimento de doenças sistémicas graves como endocardite infecciosa, doença hepática, doença renal, bronquite crónica e fibrose e enfisema pulmonar (Niemieć 2011; McFadden and Marretta 2013; Santos 2018; Stepaniuk 2019). A diabetes *mellitus*, já referida como um dos fatores etiológicos da



DP, pode também ser considerada uma doença exacerbada pela mesma, já que alguns estudos indicam uma maior resistência à insulina por parte de doentes com DP avançada (Niemiec 2011; Santos 2018).

Apesar das consequências sistêmicas da DP ainda não estarem bem caracterizadas, é de grande importância a implementação de um manejo não só apenas dentário, mas também incluindo exames de rotina a nível sistêmico. A comunicação acerca dos perigos desta doença em outros sistemas pode ser essencial na obtenção de uma maior cooperação por parte dos cuidadores (Niemiec 2011).

### **1.6. Tratamento médico e cirúrgico**

A principal causa do desenvolvimento da DP é a deposição de placa dentária e, como tal, o principal objetivo do tratamento desta doença é contrariar esta deposição. Idealmente, a intervenção médico-veterinária deveria ocorrer logo que são detetados os primeiros sinais de gengivite, e antes da perda irreversível de ligamento periodontal (Gorrel 2004a; Fiorellini et al. 2018; Stepaniuk 2019).

Qualquer tratamento da DP deve ser realizado sob anestesia e após uma lavagem da cavidade oral com uma solução de clorexidina entre 0,12 e 0,2%. Esta lavagem tem como objetivos prevenir ou diminuir a ocorrência de bacteriemia transitória após o tratamento, assim como reduzir a dispersão de bactérias sob a forma de aerossóis para o ambiente e intervenientes no procedimento, evitando a sua contaminação (Niemiec 2008; Albuquerque et al. 2012; McFadden and Marretta 2013).

O tratamento aplicado pode ser de 2 tipos, não cirúrgico ou cirúrgico. A primeira linha de tratamento é sempre a não cirúrgica e tem como objetivo a eliminação de fatores etiológicos responsáveis pelo desenvolvimento da DP, assim como a prevenção da sua progressão. Os tratamentos não cirúrgicos têm por base a limpeza dentária com eliminação de placa dentária supra e subgengival. A ocorrência de hemorragia durante o processo pode também dificultar uma correta execução da técnica. Depois da limpeza deve ser realizado um polimento dentário de forma a deixar a superfície do dente mais lisa e retardar o aparecimento de nova placa dentária (Niemiec 2008; Soukup 2010; Albuquerque et al. 2012; Fiorellini et al. 2018). Por fim, deve ser realizada a lavagem do sulco gengival com uma solução salina estéril ou de clorexidina a 0,12%, de forma a retirar os detritos de cálculo e da pasta utilizada no polimento, que se acumulam após o tratamento e que podem retardar a resolução da inflamação (Niemiec 2008).

Este tipo de tratamento é normalmente aplicado em animais em fase 1 da doença (Bellows 2004).

Para animais diagnosticados com fase 2 da doença, o tratamento aplicado deve incluir as mesmas técnicas já descritas para a fase 1, podendo ainda incluir a aplicação de

antibióticos a nível local em casos selecionados. A aplicação destes fármacos localmente permite a obtenção de uma concentração suficientemente elevada de forma a inibir a formação biofilmes sendo, ao mesmo tempo, uma opção mais segura no contexto do desenvolvimento de resistências aos antibióticos (Zetner and Rothmueller 2002; Bellows 2004; Soukup 2010).

A utilização de antibióticos sistémicos é geralmente contraindicada devido à necessidade de administração de uma dose bastante elevada para que estes atuem a nível dos biofilmes bacterianos. Existem, no entanto, alguns casos em que estes podem ser úteis como terapia adjuvante, mediante análise pelo MV do seu risco/benefício, como por exemplo em animais com doença cardiovascular concomitante, próteses, imunocomprometidos ou com fraca capacidade cicatrização. Nestes casos, os antibióticos mais utilizados são o hidrocloreto de clindamicina, a amoxicilina + ácido clavulânico, a doxiciclina e o metronidazol (Soukup 2010; Albuquerque et al. 2012).

A resposta inflamatória sistémica desencadeada pela deposição de placa bacteriana é um dos fatores que influenciam o desenvolvimento da DP, devendo ser controlada sem afetar os benefícios relacionados com o controlo da doença. Para controlo da resposta inflamatória sistémica pode-se recorrer à administração de doxiciclina ou de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). A aplicação de uma dose subinibitória de doxiciclina, cerca de 20% da dose mínima inibitória, é utilizada como forma de controlo da expressão de metaloproteinases da matriz, responsáveis pela degradação do periodonto. Este composto regula também a produção de colagénio, aumentando a estabilidade da ligação do dente ao osso alveolar (Soukup 2010; Lobprise and Stepaniuk 2019). A utilização de AINEs está descrita como forma de controlo da formação de prostaglandinas, principalmente de PGE2, também responsáveis pela destruição do periodonto, mais concretamente do osso alveolar. Esta administração deve ser realizada durante longos períodos de tempo, pelo que existem riscos da ocorrência de efeitos secundários (Soukup 2010; Lobprise and Stepaniuk 2019).

Em casos de doença avançada, PD3 ou PD4, deve ser aplicado tratamento cirúrgico (Niemic 2008; Soukup 2010; McFadden and Marretta 2013). Os objetivos do tratamento cirúrgico são a obtenção de acesso a áreas que necessitem de intervenção de forma promover a regeneração de tecidos do periodonto, a correção de alterações que tenham ocorrido a nível das paredes do sulco gengival e a redução ou eliminação do mesmo. O tratamento cirúrgico aplicado a nível gengival pode ser de 3 tipos: curetagem gengival, gengivectomia e realização de retalhos gengivais. Em todos os casos a área acedida deve sempre ser desbridada, com remoção da placa, cálculo, tecidos inflamados e qualquer tipo de componente que possa comprometer uma boa cicatrização (Lobprise and Stepaniuk 2019).

A realização da curetagem gengival tem como objetivo a limpeza do sulco gengival através da remoção de tecidos inflamados e cálculo. A gengivectomia pode ser utilizada para

redução da profundidade do sulco gengival e obtenção de uma melhor visibilidade na realização de limpezas dentárias. Esta técnica é também utilizada isoladamente em casos de hiperplasia gengival (Niemiec 2012a).

Os retalhos gengivais permitem o acesso à raiz do dente, preservação da gengiva aderida e reestruturação do formato da gengiva de forma a reduzir o sulco gengival ou cobrir superfícies expostas. Esta técnica inclui o destacamento de uma porção de tecido, mantendo uma zona de ligação à origem, o pedículo, responsável pela circulação sanguínea e nutrição (Bellows 2004). Existem diversas técnicas de realização de retalho, no entanto todas devem garantir a preservação do máximo de gengiva aderida possível, a promoção de uma cicatrização primária em detrimento da cicatrização por segunda intenção e a formação de um pedículo pelo menos 1,5 vezes superior ao tamanho da margem livre. Durante a realização desta técnica, podem ser detetados defeitos a nível do osso alveolar, que devem ser corrigidos por alveoloplastia antes da sutura do retalho (Bellows 2004; Niemiec 2012b). É ainda importante referir que cerca de 2 a 4 semanas antes da cirurgia de retalho, deve ser realizada uma limpeza dentária completa, de forma a diminuir a carga bacteriana oral e a inflamação, resultando em tecidos menos friáveis (Niemiec 2012b).

Todas estas técnicas podem ser combinadas de forma a obter o máximo de sucesso terapêutico. No caso de não ser possível a aplicação de nenhuma das técnicas conhecidas, o tratamento definitivo da DP passa pela extração dentária (Niemiec 2008).

## **2. MICROBIOTA PERIODONTAL**

### **2.1. Microbiota oral canina**

O primeiro cientista a observar microrganismos ao microscópio foi Anton van Leeuwenhoek, em 1683. Entre muitas outras amostras, examinou pela primeira vez uma amostra de placa dentária humana que, anos mais tarde, os cientistas iriam descrever como biofilme (Huang et al. 2011). Sabe-se hoje que a cavidade oral canina é colonizada por diversos microrganismos tais como bactérias, vírus, fungos e protozoários. As bactérias representam a maioria destes organismos, sendo indispensáveis para a saúde do hospedeiro devido à sua intervenção na proteção contra a colonização por organismos exógenos (Sturgeon et al. 2013; Kačírová et al. 2019).

Relativamente à constituição do microbioma oral canino, este não é semelhante ao microbioma oral humano, ao contrário do que se pensou durante muitos anos. De facto, estudos de comparação entre sequências de 16S rADN encontradas na cavidade oral canina e na cavidade oral humana permitiram concluir que apenas 16,4% das sequências partilhavam mais de 98,5% de homogeneidade (Dewhirst et al. 2012; Davis et al. 2013).

A microbiota oral canina é constituída, essencialmente, por espécies bacterianas pertencentes a seis filos, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria,

*Fusobacteria* e *Spirochaetes* (Davis et al. 2013; Sturgeon et al. 2013; Wallis et al. 2015). As espécies bacterianas presentes são, na sua grande maioria, gram-negativas e aeróbias pertencentes aos géneros *Moraxella*, *Bergeyella*, *Neisseria* e *Capnocytophaga*. Existem também algumas espécies gram-positivas, sendo as mais comuns as pertencentes aos géneros *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. A espécie *Porphyromonas cangingivalis*, gram-negativa anaeróbia estrita, é descrita como a mais frequente, podendo estar presente em animais saudáveis ou com sinais de DP (Davis et al. 2013; Wallis et al. 2015; Pieri et al. 2018; Sanguansermisri et al. 2018).

A nível parasitário, a presença dos protozoários *Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax* na cavidade oral canina encontra-se descrita, sendo o primeiro frequentemente encontrado nos sulcos gengivais. Ambos os parasitas já foram identificados em animais com e sem indícios de DP (Patel et al. 2017; Kačírová et al. 2019).

A nível micológico, a espécie de fungo mais frequentemente isolada a partir da cavidade oral canina é *Malassezia pachydermatis*, podendo estar presente em animais com ou sem sinais de doença. Para além do género *Malassezia*, fazem parte da microbiota oral canina outros géneros fúngicos, tais como *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* (Brito et al. 2009; Santin et al. 2013).

## **2.2. Fases de desenvolvimento da DP**

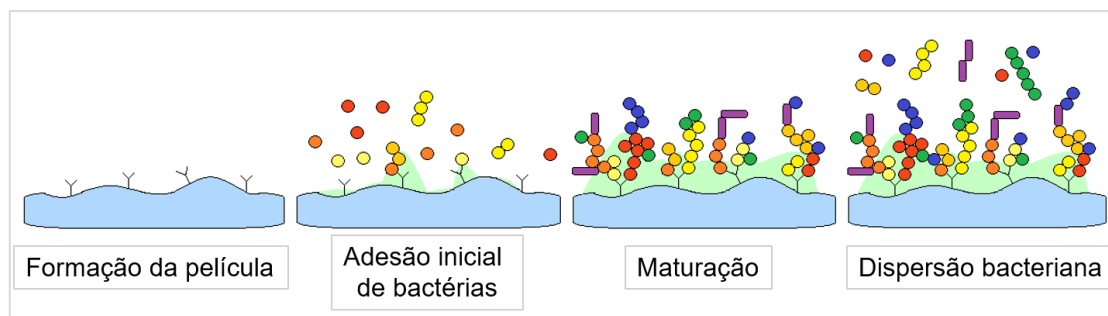
Tal como referido anteriormente, a DP é uma afeção inflamatória, infecciosa e progressiva, que pode assumir duas formas diferentes, a periodontite (inflamação do periodonto) ou a gengivite (inflamação da gengiva), que podem ocorrer em conjunto ou em separado (Niemic 2011; Stepaniuk 2019).

O desenvolvimento da DP inicia-se com a formação da placa dentária. Esta define-se como um biofilme composto maioritariamente por bactérias contidas numa matriz de glicoproteínas salivares, lípidos, detritos celulares e polissacáridos extracelulares e que pode ocorrer a nível supra ou subgengival (Niemic 2011; Lobprise and Stepaniuk 2019). A formação da placa ocorre mais facilmente quando não existe ingestão de alimentos durante um grande período de tempo, por exemplo quando o animal se encontra a dormir. De facto, a ação mecânica dos alimentos e da saliva durante a alimentação causa uma diminuição da formação de placa (Stepaniuk 2019).

A formação de tártaro ou cálculo dentário ocorre através da mineralização de sais de fosfato e carbonato de cálcio, assim como de pequenas quantidades de magnésio, potássio e sódio, presentes na saliva. No entanto, doentes com DP avançada podem não apresentar cálculo dentário, e vice-versa. Este, não estando relacionado diretamente com a evolução da doença, é apenas responsável pelo aumento de área disponível para a formação de biofilme, assim como pela irritação mecânica da gengiva (Soukup 2010).

Os biofilmes estão presentes em diversos ecossistemas, podendo a sua constituição estar relacionada com a evolução ou não de doença (Stoodley et al. 2002). Trata-se de uma associação complexa entre bactérias que se ligam e multiplicam numa superfície sólida e formam uma comunidade adaptada às condições locais, capaz de inibir a ação antimicrobiana e limitar as defesas naturais do hospedeiro (López et al. 2010; Huang et al. 2011). Estima-se que as bactérias constituintes dos biofilmes sejam entre 10 a 1000 vezes mais tolerantes à ação de antimicrobianos e desinfetantes do que as respetivas formas planctónicas devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência, tais como a modificação de recetores ou destruição enzimática dos antibióticos (AB) (Stempel et al. 2014).

A formação do biofilme dentário ocorre em 4 fases: formação da película, adesão inicial de bactérias, maturação e dispersão bacteriana (Huang et al. 2011; Kačirová et al. 2019) (figura 8). A primeira fase inicia-se alguns segundos após a limpeza dentária, com a deposição na coroa dentária de uma fina película formada essencialmente por glicoproteínas salivares, responsável pela interação entre o dente, fluidos orais e microrganismos. Algumas horas depois, inicia-se a segunda fase de formação de biofilme, com a colonização da película por bactérias gram-positivas e gram-negativas aeróbias, designadas por colonizadores primários. Estas bactérias reconhecem as proteínas de ligação presentes na película, como é o caso da  $\alpha$ -amilase, e ligam-se a estas, iniciando de imediato a secreção de polissacáridos extracelulares de forma a fortalecer as ligações. Para além da ligação à película estas desenvolvem também processos de auto-agregação (entre representantes da mesma espécie), co-agregação (entre microrganismos de espécies diferentes) e multiplicação. Nesta fase, as ligações são reversíveis e as bactérias podem-se destacar da película facilmente (Huang et al. 2011; Kačirová et al. 2019; Stepaniuk 2019). Durante a terceira fase, de maturação, a quantidade de oxigénio subgengival disponível diminui devido à ação isolante do biofilme formado e ao aumento de bactérias aeróbias a nível marginal, criando condições para a multiplicação de organismos anaeróbios (Stepaniuk 2019). Os colonizadores secundários e terciários reconhecem as proteínas de ligação e os polissacáridos extracelulares dos colonizadores primários, ligando-se a estes. Assim, bactérias que não possuam capacidade de ligação à película formada inicialmente, podem também integrar o biofilme, contribuindo para o seu desenvolvimento. Os processos de co-agregação bacteriana mencionados constituem um fenómeno bastante importante na formação do biofilme. Esta ligação é bastante específica e é mediada pelas adesinas presentes na superfície de um microrganismo, que se ligam a recetores específicos presentes na superfície de outro microrganismo (Rickard et al. 2003; Huang et al. 2011; Katharios-Lanwermyer et al. 2014).



**Figura 8 - Fases de formação do biofilme (original do autor)**

O intervalo de tempo entre a formação inicial do biofilme e a sua maturação é de cerca de 24h, período necessário para que se estabeleçam as condições necessárias à proliferação de bactérias anaeróbias (Stepaniuk 2019). É importante referir que estudos da avaliação microbiológica de amostras de placa dentária, em animais em diferentes fases de DP, permitiram concluir que o desenvolvimento desta doença pode não estar relacionado com o aparecimento de novas espécies de bactérias patogénicas, mas sim com a diminuição de proporção de bactérias aeróbias em relação às anaeróbias (Papadimitriou et al. 2016).

Na última fase de formação do biofilme, conhecida como fase da dispersão bacteriana, ocorre a libertação de bactérias individualmente ou em aglomerados. Esta libertação pode ocorrer devido à escassez de nutrientes no local de adesão inicial, induzindo as bactérias a procurarem um local com características mais favoráveis à sua multiplicação, ou devido aos mecanismos de defesa do hospedeiro contra a formação do biofilme, incluindo a produção de saliva (Huang et al. 2011).

Durante a formação do biofilme, os microrganismos anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos proliferam para a placa subgengival, produzindo e libertando diversos metabolitos, incluindo amónia, compostos sulfúricos voláteis, citotoxinas, endotoxinas, e enzimas proteolíticas com capacidade de invadir a gengiva e o periodonto. Estes compostos bacterianos promovem a atração de neutrófilos, através de reações de quimiotaxia, vasodilatação e ativação dos sistemas complemento, cinina-caliceína e cascata do ácido araquidónico. Os lipopolissacáridos bacterianos, assim como outros produtos do seu metabolismo, estimulam componentes celulares como monócitos, fibroblastos e células endoteliais e epiteliais a produzir citocinas que, por sua vez, estimulam a resposta inflamatória e processos catabólicos tais como a reabsorção óssea e destruição de colagénio, levando à destruição do periodonto. A desgranulação de mastócitos, assim como a ação local de leucócitos, fibroblastos, osteoclastos e osteoblastos, levam à libertação de proteínases, citocinas e prostaglandinas que contribuem para o aumento da resposta inflamatória (Albuquerque et al. 2012; Cunha et al. 2017). Apesar de inicialmente se considerar que a DP se desenvolvia apenas devido à colonização bacteriana do sulco gengival, hoje sabe-se que

a destruição do periodonto é causada pela combinação entre a ação direta dos fatores de virulência bacterianos e a resposta inflamatória do hospedeiro. Os doentes com um sistema imunitário deficiente têm uma baixa capacidade de produzir uma resposta inflamatória eficaz, fazendo com que a inflamação se mantenha durante longos períodos de tempo, provocando o agravamento da doença (Niemiec 2011; McFadden and Marretta 2013).

A associação entre a DP e diversas espécies bacterianas aeróbias e anaeróbias encontra-se descrita. Estas espécies incluem bactérias gram-positivas pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Actinomyces* e *Propionibacterium* e, bactérias gram-negativas, pertencentes aos géneros *Neisseria*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Actinobacillus*, *Eikenella*, *Capnocytophaga*, *Escherichia*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* (Wallis et al. 2015). Os géneros *Neisseria* e *Corynebacterium* são exemplos de géneros mais frequentemente identificados como colonizadores primários (Holcombe et al. 2014).

### **2.3. *Neisseria zoodegmatis***

*Neisseria zoodegmatis* é uma espécie bacteriana pertencente ao género *Neisseria*, família Neisseriaceae e filo Proteobacteria. Este género foi descrito pela primeira vez em 1879 por Albert Neisser, na Universidade de Breslau da Alemanha. Neisser observou pequenos diplococos em amostras de exsudado ureteral de doentes com gonorreia e em amostras de indivíduos com conjuntivite, descrevendo uma espécie que viria mais tarde a ser conhecida como *Neisseria gonorrhoeae* (Kampmeier 1978; Liu et al. 2015). As espécies pertencentes a este género são constituídas por cocos gram-negativos, oxidase positivos e aeróbios, e apresentam poucas diferenças tanto a nível fenotípico como genotípico, sendo a sua diferenciação definitiva apenas possível através de análises genómicas completas (Bennett et al. 2014).

Diversas espécies de *Neisseria* são consideradas como comensais da espécie canina, estando a sua presença descrita na cavidade oral, nomeadamente na placa dentária e fluidos orais, cavidade nasal e garganta (Liu et al. 2015). A espécie *Neisseria zoodegmatis* foi inicialmente classificada pelo Center of Disease Control como pertencente ao grupo Eugonic Fermenter-4. Esta designação foi utilizada pela primeira vez em 1974 por Tatum et al., na descrição de um grupo de organismos sacarolíticos gram-negativos presentes em amostras obtidas a partir de feridas em humanos causadas pela mordedura de cães e gatos (Tatum et al. 1974; Vandamme et al. 2006). As espécies deste grupo podem ser também classificadas como patogénicas oportunistas já que, para além da sua associação com estas feridas, também já foram isoladas a partir de casos de pneumonia em cães e gatos e infeções respiratórias e septicémia em humanos (Ganière et al. 1995).

*Neisseria zoodegmatis* produz colónias circulares, convexas, opacas, brilhantes, sem relevo, hemolíticas e catalase-positivas. Esta espécie tem capacidade de multiplicação a 37°C e a temperatura ambiente (18-22°C), e apresenta capacidade de se multiplicar em meio MacConkey (Vandamme et al. 2006).

#### **2.4. *Corynebacterium canis***

O género *Corynebacterium* foi mencionado pela primeira vez em 1896, por Lehman e Neumann, para descrever uma estirpe de bacilo posteriormente classificada como *Corynebacterium diphtheriae* (Araújo et al. 2018). Este género pertence ao filo Actinobacteria, e família Corynebacteriaceae (Bernard and Funke 2015). As espécies bacterianas pertencentes a este género são caracterizadas como bacilos gram-positivos, catalase positivos, oxidase negativos e não esporulados. Encontram-se presentes na microbiota da pele e nas membranas mucosas de diversos animais, assim como no meio ambiente, incluindo na água e solo.

As espécies com interesse para a medicina podem ser classificadas em diftéricas ou não diftéricas. A diferença entre estes dois grupos de microrganismos reside na capacidade de os primeiros apresentarem a capacidade de produzirem a toxina diftérica, devido à presença do gene *tox*. Os organismos pertencentes ao grupo não diftérico são classificados como patogénicos oportunistas (Bernard 2012; Bernard and Funke 2015; Araújo et al. 2018).

A espécie *Corynebacterium canis* foi descrita pela primeira vez em 2009, depois de isolada a partir de uma amostra retirada de uma ferida humana causada pela mordedura de um cão. Microscopicamente apresenta forma de haste, ligeiramente mais larga nas extremidades, ou filamentosa, observando-se individualmente ou em grupo. As suas colónias são esbranquiçadas, secas e irregulares, com cerca de 1-2mm de diâmetro. Esta espécie é anaeróbia facultativa e não diftérica (Funke et al. 2010).

Como mencionado anteriormente, as bactérias presentes no biofilme dentário produzem uma série de compostos com capacidade de danificar o periodonto. *C. canis* produz tripsina, uma enzima com capacidade de clivagem de proteínas, encontrando-se associada com a capacidade de sobrevivência da espécie na cavidade oral canina (Funke et al. 2010). Esta espécie já foi associada a casos de gengivite e periodontite ligeira (Davis et al. 2013; Wallis et al. 2015).

#### **2.5. *Porphyromonas cangingivalis***

A designação *Porphyromonas* foi sugerida pela primeira vez em 1988, por Shah e Collins (Saha and Collins 1988). O nome *Porphyromonas* deriva da capacidade de produção de um pigmento roxo, a porfirina (em inglês: “porphyrin”).



A maioria das espécies pertencentes a este género foram isoladas a partir de amostras da cavidade oral de humanos, cães, gatos e primatas. Estas espécies são compostas por bacilos gram-negativos, anaeróbios estritos, não esporulados e não móveis (Gibson and Genco 2006). A espécie *Porphyromonas cangingivalis* foi descrita pela primeira vez por Collins et al., em 1994, após isolamento a partir de amostras subgengivais da placa bacteriana de cães com DP. Esta espécie é responsável por parte da halitose presente na DP devido à libertação de produtos resultantes de processos de fermentação, tais como n-butirato, propionato e acetato (Gibson and Genco 2006). A sua multiplicação em meio de agar sangue durante 48h origina colónias com cerca de 1mm de diâmetro, circulares, convexas, não hemolíticas, com superfície lisa e de cor branca acastanhada. A suplementação dos meios de cultura com hemina e vitamina K favorece a multiplicação desta espécie (Collins et al. 1994). A temperatura ótima de multiplicação é de 37°C e microscopicamente apresenta a forma de cocobacilos (Summanen and Finegold 2015).

Esta espécie está descrita em vários estudos como uma das mais abundantes na cavidade oral canina. A sua presença em casos de DP, assim como em animais saudáveis, sugere uma elevada capacidade metabólica e de adaptação (Davis et al. 2013; O'Flynn et al. 2015; Wallis et al. 2015). Ao longo dos últimos anos têm sido realizados diversos estudos com o objetivo de tentar compreender quais as características desta espécie que lhe permitem sobreviver em ambiente aeróbio e saudável. A presença da enzima catalase permite que as bactérias aeróbias sobrevivam na presença de oxigénio. A redução do oxigénio pelas bactérias origina diversos produtos extremamente tóxicos como é o caso do peróxido de hidrogénio, sendo que a catalase é uma enzima que apresenta a capacidade de decompor este produto. Estima-se que a produção desta enzima por *P. cangingivalis* representa um fator importante na tolerância desta espécie a ambientes ricos em oxigénio, como é o caso da placa dentária canina em cães saudáveis (Willey et al. 2008a; O'Flynn et al. 2015).

O grupo Heme está presente em muito pouca quantidade nas gengivas saudáveis. Este fator tem um papel importante na multiplicação, defesa e virulência das bactérias. A maioria das espécies de *Porphyromonas* presentes na cavidade oral canina adquirem o fator heme pela clivagem da hemoglobina presente no sangue através da ligação aos tecidos gengivais. No entanto, esta ligação tem a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro, constituindo uma desvantagem para esta espécie e levando-a a desenvolver outros métodos de obtenção do grupo heme. *P. cangingivalis* é uma das duas únicas espécies deste género que possui os genes necessários à síntese de protoporfirina IX, um precursor desse composto, o que representa uma vantagem para a sobrevivência na cavidade oral canina saudável (O'Flynn et al. 2015).

## **2.6. *Peptostreptococcus canis***

A espécie *Peptostreptococcus canis*, pertencente à família Peptostreptococcaceae e filo Firmicutes, é composta por bactérias gram-positivas, não esporuladas e anaeróbias estritas (Ezaki 2009).

O género *Peptostreptococcus* foi descrito pela primeira vez em 1936, por Kluyver e van Niel. Inicialmente composto por cerca de dezoito espécies, o género sofreu uma reestruturação graças aos avanços da análise genómica, que levou a que algumas espécies tenham sido reclassificadas restando apenas o *Peptostreptococcus anaerobius* enquanto espécie única. A espécie *P. canis* foi descrita pela primeira vez em 2009 por Lawson et al., tendo sido isolada a partir de amostras subgengivais de placa bacteriana canina (Lawson et al. 2012).

*P. canis* é formada por cocos catalase e oxidase negativos. A sua multiplicação ocorre nos meios brucella agar e chocolate agar, durante 72h, a uma temperatura ótima de 37°C, mas podendo variar entre os 10-45°C. As colónias apresentam cerca de 1-1,5mm de diâmetro e são circulares, lisas não hemolíticas e com uma cor branca acinzentada brilhante. Também apresentam a capacidade de se multiplicar em meios com concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 6,5% (Lawson et al. 2012).

A presença de bactérias pertencentes a este género está confirmada em casos de DP avançada com presença de periodontite, sendo que a sua concentração tende a aumentar ao longo da evolução da doença (Lawson et al. 2012).

## **2.7. *Enterococcus faecalis***

O género *Enterococcus* da família Enterococcaceae foi descrito pela primeira vez em 1899 por Thiercelin e Jouhaud. O nome proposto tem por base a morfologia observada, de diplococos, e o local de origem das amostras, o trato gastrointestinal humano (Thiercelin and Jouhaud 1899; Lebreton et al. 2014).

O género *Enterococcus* é comensal no trato genital feminino e trato gastrointestinal de humanos, diversos mamíferos e aves. Em ambiente equilibrado, este género não representa nenhuma ameaça para os seus hospedeiros, sendo considerado benéfico em diversas doenças gastrointestinais e sistémicas e algumas das suas espécies utilizadas como probióticos. No entanto, em casos onde o equilíbrio ambiental é alterado, este género pode ser responsável por doenças como endocardite, bacteriémia, meningite, infeções urinárias, intra-abdominais e de feridas (Koch et al. 2004; Lebreton et al. 2014; Oliveira et al. 2016).

A espécie *Enterococcus faecalis* é composta por cocos ovóides gram-positivos, catalase negativos e não hemolíticos. As suas colónias são circulares e lisas e microscopicamente organizam-se individualmente, em diplococos ou em cadeia. A sua temperatura ótima de multiplicação varia entre os 35°C e os 37°C (Schleifer and Kilpper-Balz

1984; Willey et al. 2008b; Svec and Devriese 2009). Esta espécie é considerada aeróbia tolerante, já que a sua multiplicação não é afetada pela presença ou ausência de oxigénio no ambiente (Willey et al. 2008a).

O género *Enterococcus* foi várias vezes documentado como presente na cavidade oral canina de animais com DP (Cunha et al, 2017; Oliveira et al. 2016; Semedo-Lemsaddek et al 2016). Estirpes de *E. faecalis* obtidos a partir de amostras da cavidade oral de cães diagnosticados com DP, apresentam a capacidade de produção de diversos fatores de virulência, tais como adesinas, responsáveis pela sua capacidade de colonização, de ligação as células recetoras do hospedeiro e de formação de biofilmes bacterianos (Oliveira et al. 2016).

## **2.8. Importância dos modelos *in vitro* em microbiologia clínica**

Durante muitos anos, a maioria dos estudos realizados na área de microbiologia clínica eram centrados em bactérias na sua forma planctónica. Nas últimas décadas assistiu-se à descoberta cada vez mais frequente da colonização de tecidos por biofilmes, assim como a sua presença e importância em variadas doenças como infeções do aparelho urinário, infeções do trato respiratório, otites, endometrioses e periodontites, confirmando a importância do estudo da formação e sobrevivência dos biofilmes, de forma a compreender as suas características principais e desenvolver métodos de controle. Os biofilmes presentes na cavidade oral constituíram alguns dos primeiros a serem identificados em tecidos humanos (Lebeaux et al. 2013; Bahamondez-Canas et al. 2019).

De facto, a utilização de modelos *in vitro* para o estudo de biofilmes é uma das formas mais acessíveis de responder a questões sobre a sua formação, fisiologia e arquitetura. Estes são normalmente económicos e fáceis de realizar, sendo possível a reprodução de diferentes gradientes de gases, nutrientes, produtos metabólicos e densidade celular. Para além disto, estes modelos não envolvem questões éticas relacionadas com a utilização de animais como por exemplo primatas ou canídeos ou, questões relacionadas com a baixa semelhança anatómica que advém da utilização de pequenos mamíferos como roedores e leporídeos. No entanto, estes modelos apresentam também algumas desvantagens devido à dificuldade em obter um ambiente de multiplicação completamente igual ao encontrado na natureza assim como de reprodução das reações de resposta do hospedeiro (Lebeaux et al. 2013; Cunha et al. 2017).

### **3. OPÇÕES TERAPÊUTICAS E PREVENÇÃO**

#### **3.1. Outras formas de prevenção da doença periodontal**

A prevenção da DP envolve um conjunto de medidas especificamente realizadas por um MV competente, e que devem ser complementadas por outras realizadas pelo cuidador do animal (Roudebush et al. 2005; Stepaniuk 2019).

Segundo a “American Animal Hospital Association”, a saúde oral de um animal deve ser acompanhada desde cedo pelo MV, mesmo antes do aparecimento dos dentes permanentes. Nesta altura deve ser avaliada a ausência ou atraso na erupção dentária e problemas oclusivos relacionados com o tamanho da mandíbula ou posição dentária. Animais com predisposição para DP, como por exemplo raças pequenas ou braquicefálicos, devem ser sinalizados e os cuidadores informados de possíveis problemas futuros. Mais tarde, com o início da erupção dos dentes permanentes, as medidas de prevenção incluem a identificação de dentes decíduos persistentes, dentes permanentes retidos ou ausência de dentes. A primeira profilaxia completa deve ser realizada quando completado o primeiro ano de idade, no caso de raças pequenas e médias, ou dois anos de idade, no caso de raças grandes e gigantes. Esta envolve a realização de limpeza dentária, polimento e radiografias intraorais (Bellows et al. 2019). O intervalo de tempo entre avaliações pode variar entre 3 a 12 meses, dependendo da presença ou não de DP e, caso esta seja diagnosticada, da fase em que se encontra (Soukup 2010).

Logo que a erupção dos dentes permanentes esteja completa, o cuidador do animal deve ser informado das medidas de prevenção que poderá realizar fora do consultório médico-veterinário, e que podem ser divididas em medidas ativas e passivas (Niemiec 2008; Bellows et al. 2019). As medidas ativas, incluindo a escovagem dos dentes e a lavagem da cavidade oral com soluções antissépticas, são atualmente consideradas as mais importantes (Niemiec 2008; Niemiec et al. 2018). A escovagem dos dentes é considerada a medida mais eficaz de controlo da placa dentária. Para além da ação mecânica aplicada pela escova, as pastas de dentes utilizadas podem ainda conter alguns aditivos que aumentam a palatibilidade e estimulam a proteção pela saliva. Estes produtos podem ainda ser utilizados como veículos de transporte de compostos específicos para o controlo da placa, como é o caso dos quelantes do cálcio. A frequência ideal de escovagem é de uma vez ao dia e mínima de três vezes por semana. Em doentes com diagnóstico de DP pode mesmo ser necessária a escovagem duas vezes ao dia para que a medida seja eficiente. A técnica de escovagem dos dentes envolve o posicionamento da escova de modo a formar um ângulo de 45° com a gengiva marginal e a realização de movimentos circulares – Técnica de Bass (Roudebush et al. 2005; Niemiec 2008; Lobprise and Stepaniuk 2019). A solução antisséptica mais utilizada nas lavagens da cavidade oral é a clorexidina, estando indicada para a redução da gengivite. Outras soluções

conhecidas com o mesmo efeito são o gel de ascorbato de zinco e alguns aditivos para a água contendo xilitol (Niemiec 2008; Soukup 2010).

As medidas passivas devem ser vistas como um complemento às anteriores. A utilização de ração com textura, forma e tamanho que promovam a mastigação é uma forma eficaz de aumentar a remoção mecânica da placa dentária. Os aditivos já mencionados podem também ser adicionados à ração. No caso dos brinquedos, existem evidências de que materiais como a celulose ou couro seco apresentam algumas vantagens em relação aos restantes, principalmente aos de corda ou tecido (Soukup 2010; Niemiec et al. 2018).

As medidas de prevenção realizadas em casa têm um impacto muito importante na velocidade de desenvolvimento da DP. Estima-se que duas semanas após a realização da limpeza dentária profissional, e caso não sejam realizadas medidas de prevenção, ocorre a reinfeção do sulco periodontal e, após seis semanas, o animal retoma ao estado de doença em que se encontrava antes do tratamento (Niemiec et al. 2018).

## **3.2. Nisina**

### **3.2.1. Características gerais**

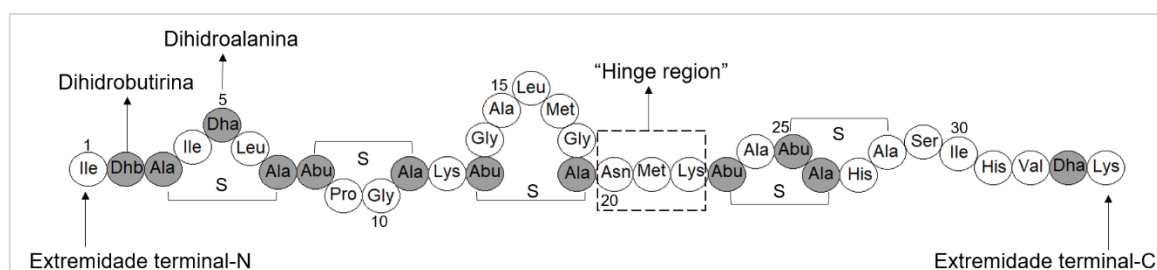
A terapia antimicrobiana é muitas vezes utilizada como complemento aos diversos tratamentos de DP conhecidos. No entanto, a utilização de AB tem como desvantagem o desenvolvimento e disseminação de estirpes resistentes. Para além disso, os biofilmes, que estão na base de desenvolvimento desta doença, são comunidades heterogêneas, complexas e formados por diversos polímeros extracelulares, o que dificulta a ação eficiente dos AB. Assim, a investigação de novas terapêuticas é essencial para o desenvolvimento de métodos alternativos, mais seguros e eficazes (Wang et al. 2015; Cunha et al. 2018).

As bacteriocinas são péptidos antimicrobianos anfipáticos e catiónicos, de baixo peso molecular. São constituídas por cerca de 12-100 aminoácidos e produzidas por bactérias, particularmente pelas bactérias do ácido láctico. Estes péptidos são sintetizados a nível ribossomal, como parte da resposta imunitária das bactérias contra agentes patogénicos, contribuindo assim para a sua sobrevivência (Stempel et al. 2014; Sugawara and Nikaido 2014; Field et al. 2015; Cunha et al. 2018). As bacteriocinas têm sido utilizadas ao longo dos anos como aditivos alimentares devido às vantagens que apresentam em relação aos antibióticos (Zendo et al. 2010; Sugawara and Nikaido 2014). Durante os últimos anos, tem sido investigada a aplicação destes compostos no controlo da formação de biofilmes e na destruição de biofilmes previamente formados, quer estes sejam constituídos por bactérias gram-negativas ou gram-positivas. (Gorr and Abdolhosseini 2011; Cunha et al. 2018).

A primeira bacteriocina a ser descrita foi a nisina, descoberta em 1928 por Rogers e Whittier a partir de culturas de leite fermentado (Rogers and Whittier 1928; Zendo et al. 2010;

Shin et al. 2016). Em 1953 obteve licença de comercialização enquanto aditivo alimentar (E234) e até ao presente foi aprovada como segura por organizações como a “Food and Agriculture Organization/ World Health Organization”, “European Food Safety Authority” e a “Food and Drug Administration”. As razões que levaram à sua aprovação foram, entre outras, a facilidade de degradação deste composto por parte das proteases intestinais, a ausência de risco para a saúde humana e a ausência de influência no sabor ou odor dos alimentos (Gharsallaoui et al. 2016). Atualmente é utilizada em mais de 50 países na indústria dos laticínios e alimentos enlatados (Field et al. 2015; Shin et al. 2016; Cunha et al. 2018).

A nisina é produzida por *Lactococcus lactis*, uma bactéria gram-positiva. É composta por 34 aminoácidos, que incluem alguns resíduos resultantes de modificações após a sua fase de tradução, como é o caso da dihidroalanina e dihidrobutirina, e anéis de lantionina e  $\beta$ -metilantionina. Estes últimos conferem-lhe a classificação de bacteriocina de classe I, também conhecidos como lantibióticos que apresentam um espectro de ação alargado, baixa probabilidade de desenvolvimento de resistências e baixa citotoxicidade (Cheigh and Pyun 2005; Field et al. 2015; Shin et al. 2016). Sendo uma molécula anfipática, a nisina possui uma extremidade hidrofóbica, terminal-C, e uma extremidade hidrofílica, terminal-N (Tong et al. 2010) (figura 9).



**Figura 9 - Molécula de nisina (original do autor)**

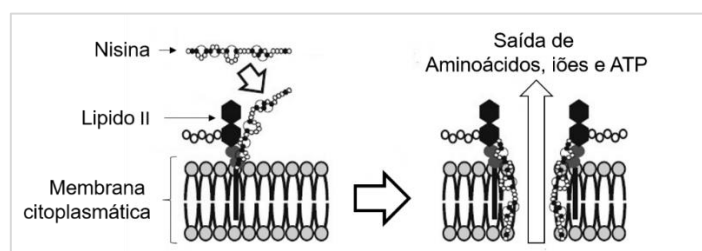
Legenda: Ala-S-Ala – Lantionina; Abu-S-Ala -  $\beta$ -metilantionina

### 3.2.2. Mecanismos de ação

A nisina atua essencialmente ao nível da membrana citoplasmática, através da formação de poros (Breukink et al. 2003; Tong et al. 2010). A nisina atua ao nível do lípido II, um precursor de peptidoglicanos, através de uma ligação que ocorre entre a extremidade terminal-N da molécula de nisina e o pirofosfato constituinte do lípido II. De seguida, e devido à flexibilidade da parte central da molécula (“hinge region”), a extremidade terminal-C da nisina penetra na membrana citoplasmática. A ligação de oito moléculas de nisina a quatro lípidos II resulta na formação de um poro de cerca de 2-2,5 nm, por onde ocorre saída de compostos citoplasmáticos essenciais tais como a adenosina trifosfato (ATP), aminoácidos ou iões, causando a morte da célula (Tong et al. 2010; Zendo et al. 2010) (figura 10).

Este péptido também pode atuar através da ligação não específica a lípidos aniônicos presentes na membrana, inserindo-se entre os fosfolípidos e criando perturbações temporárias na homeostasia celular e formação de um poro (Tong et al. 2010).

Uma vez que a afinidade da nisina em relação ao lípido II é muito maior que em relação a lípidos aniônicos, o primeiro mecanismo de ação leva à formação de poros com maior estabilidade. Esta característica pode contribuir para uma variação na eficácia da nisina quando testada contra diferentes bactérias já que a sua ação depende da sua afinidade em relação à membrana citoplasmática destas (Tong et al. 2010).



**Figura 10 - Mecanismos de ação: ligação ao lípido II (adaptado de: Zendo et al. 2010)**

Para além destes dois mecanismos de ação mais frequentes, são conhecidos outros mecanismos que não envolvem a formação de poros, incluindo a inibição da síntese de peptidoglicanos através da ligação ao lípido II ou a remoção do lípido II dos locais de síntese de membrana. Ambos os mecanismos levam a complicações ao nível da síntese da membrana celular, causando a morte da célula (Hasper et al. 2006; Zendo et al. 2010).

### **3.2.3. Resistência à nisina**

A resistência à nisina encontra-se pouco caracterizada devido à ausência de descrição de casos *in vivo*, sendo que os poucos casos conhecidos foram descritos a partir de modelos *in vitro* (Shin et al. 2016).

Uma das hipóteses apresentadas como possível promotora de resistência baseava-se na influência do lípido II, já que este é o local de eleição de ligação desta molécula. Esta hipótese foi estudada por Kramer et al., em 2004, sendo rejeitada com base na ausência de resultados que comprovassem a ligação entre a quantidade de lípido II disponível e o aumento da resistência. Kramer observou também a ocorrência de uma série de modificações na parede celular que impedem a ligação da nisina ao péptido II, sugerindo que estas seriam o fator mais importante na aquisição de resistência por parte das células (Kramer et al. 2004; Shin et al. 2016).

Outros fatores de resistência descritos incluem a produção de nisinase e de proteína de resistência à nisina (NSR – “nisin resistance protein”). A nisinase é uma enzima isolada a partir de diversas bactérias do género *Bacillus*. e com capacidade de inativar a nisina. Esta

enzima, uma redutase de hidropéptidos, liga-se à dihidroalanina na posição 33 da molécula de nisina, alterando-a para alanina e inativando a molécula (Sugawara and Nikaido 2014; Draper et al. 2015; Shin et al. 2016). A NSR é uma protease com capacidade de degradação da nisina, sendo codificada pelo gene plasmídico *nsr* (gene de resistência à nisina – “nisine resistance gene”). A NSR atua ao nível da extremidade terminal-C da nisina, através da clivagem da molécula entre o último anel de metilantionina na posição 28 e o aminoácido serina (Ser) na posição 29. Esta clivagem resulta na diminuição da capacidade de formação de poros na membrana celular (Sun et al. 2009; Draper et al. 2015).

### **3.2.4. Aplicações da nisina na doença periodontal**

Ao longo dos anos diversos estudos comprovaram que a ação antimicrobiana da nisina pode ser alargada a bactérias de origem não alimentar, incluindo estirpes associadas a doenças infecciosas resistentes aos antibióticos, tais como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), estirpes associadas a doenças da cavidade oral e a doenças neoplásicas (Shin et al. 2016).

A nisina foi descrita pela primeira vez enquanto antimicrobiano para atuação na cavidade oral, em 1978, por Johnson et al., através de um estudo comparativo de placa dentária em dois grupos de macacos (*Macaca fascicularis*), cada um constituído por oito indivíduos adultos. Neste estudo, um dos grupos serviu como grupo de controlo, enquanto o outro grupo foi alimentado com uma dieta suplementada com nisina, durante cinco meses. Foi possível concluir que a placa dentária dos indivíduos alimentados com a dieta suplementada apresentava uma diminuição no número de *Streptococci* presentes na cavidade oral, em relação ao grupo de controlo (Johnson et al. 1978; Shin et al. 2016). Mais tarde, em 1993, Howell comprovou através de um estudo com cães de raça beagle que a utilização de nisina era mais eficaz do que a clorexidina na prevenção do desenvolvimento de placa bacteriana e gengivite (Howell et al. 1993). Posteriormente, Tong et al. observou a ação antimicrobiana da nisina contra algumas espécies bacterianas presentes em humanos com DP, pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*. Estas estirpes promovem uma diminuição do pH oral através da produção e libertação de produtos ácidos, derivados da digestão de carboidratos, contribuindo para a manutenção de um ambiente promotor da estabilidade e da atividade antimicrobiana da nisina. Neste mesmo estudo é ainda referido que este composto, apesar de ser inativado e degradado por enzimas digestivas, como a tripsina e a pancreatina, ao longo do trato gastrointestinal, não é afetado pela presença de enzimas, proteínas e outros compostos inorgânicos da saliva (Tong et al. 2014; Cunha et al. 2019).

A nisina está disponível comercialmente em fórmulas que não excedem os 2,5% de pureza, com 10<sup>6</sup> UI/g, e incluem proteínas lácteas desnaturadas e NaCl. Quando utilizada na



indústria alimentar, existem diversas formas deste composto ser introduzido nos alimentos, incluindo: incorporação direta do composto puro ou semi-puro, inoculação de estirpes produtoras de nisina ou inoculação numa matriz sólida composta por gel, filme ou partículas, que têm como objetivo o controlo da libertação da nisina e a proteção contra a ação de enzimas proteolíticas (Gharsallaoui et al. 2016). Apesar dos estudos já desenvolvidos envolvendo o uso da nisina como antimicrobiano para atuação na cavidade oral em casos de DP canina, dentro do nosso conhecimento, não se encontram disponíveis no mercado fórmulas que envolvam veículos de administração tópica deste composto.

### **3.3. Biogel antimicrobiano**

A utilização de uma fórmula de administração adequada é um dos grandes desafios da utilização da nisina, já que é importante evitar que esta seja inativada antes de atingir o seu local alvo. Para isso, é necessário escolher uma formulação que não altere as propriedades iniciais deste composto, que seja fácil de aplicar, que não seja rejeitado pelo animal e, finalmente, que seja economicamente viável, sendo o gel de goma de guar um forte candidato, uma vez que apresenta todos estes requisitos (Cunha et al. 2017; Trovão 2017).

O gel de goma de guar é constituído por um polissacárido natural, o galactomanano, obtido a partir do endosperma das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, pertencente à família Leguminosae (Thombare et al. 2016). Os polissacáridos naturais têm origem biológica, apresentando funções estruturais ou de armazenamento. As suas principais características são a biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade, baixo preço e grande disponibilidade na natureza (Reddy et al. 2011; Thombare et al. 2016).

O galactomanano é constituído por um eixo estrutural de D-manose com grupos laterais de D-galactose e é insolúvel em solventes orgânicos como hidrocarbonetos, álcool, éter, cetonas, excluindo apenas a formamida (figura 12). A água é o solvente mais importante deste composto já que, quando adicionada, reage com os grupos hidroxil presentes na molécula, formando pontes de hidrogénio e aumentando a viscosidade da solução. A sua elevada viscosidade, em conjunto com outras características como perfil hidrofílico, hidratante, espessante e emulsionante, rápida solubilidade em água fria, estabilidade numa larga gama de valores de pH e capacidade de formação de filmes, tornam-no um composto bastante versátil para aplicação na indústria farmacêutica (Reddy et al. 2011; Santos et al. 2016; Thombare et al. 2016; Trovão 2017).

Recentemente, estudos realizados com isolados de *Enterococcus faecalis* obtidos a partir de amostras da cavidade oral de cães diagnosticados com DP, descreveram a atividade antimicrobiana da nisina, pura ou administrada em conjunto com gel de goma de guar, contra esta espécie, na sua forma planctónica e em biofilme. Esta formula inovadora poderia

funcionar como substituto ou complemento à tradicional antibioterapia, reduzindo assim a administração de AB e todas suas desvantagens inerentes (Trovão 2017; Cunha et al. 2018).

## **PARTE III – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL**

### **1. Objetivos e fases experimentais**

Este estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de biofilme polimicrobiano representante da placa bacteriana presente na cavidade oral canina. Estabeleceu-se também um segundo objetivo: avaliar o potencial inibitório e de erradicação de um biogel antimicrobiano, composto por nisina e goma de guar, relativamente ao biofilme polimicrobiano previamente estabelecido. A escolha do produto nisina-biogel baseou-se em estudos prévios que demonstraram o seu potencial para o controlo da DP canina (Cunha et al. 2018).

Este projeto foi dividido em três fases sequenciais: em primeiro lugar procedeu-se à avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação entre diferentes espécies bacterianas presentes na cavidade oral canina; de seguida desenvolveu-se um modelo de biofilme polimicrobiano, mimetizando a placa dentária de cães com DP; por fim, procedeu-se à avaliação do potencial antimicrobiano da nisina incorporada no biogel de goma de guar, através da determinação da concentração mínima inibitória de biofilme (CMIB) e concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) do biogel relativamente ao biofilme polimicrobiano.

### **2. Materiais e métodos**

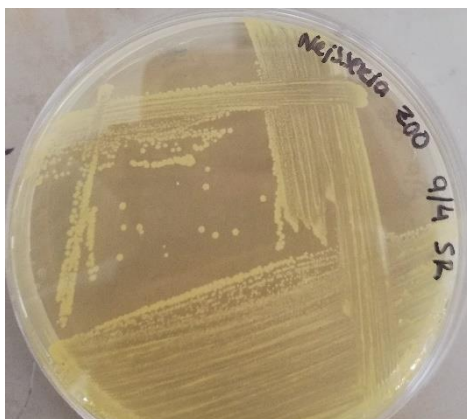
#### **2.1. Isolados bacterianos**

As espécies bacterianas selecionadas para este estudo foram recolhidas a partir da cavidade oral canina (*Porphyromonas cangingivalis* VPB 4874 e *Peptostreptococcus canis* CCUG57081) e de lesões em humanos (*Neisseria zoodegmatis* CCUG52598T e *Corynebacterium canis* CCUG58627T) (Collins et al. 1994; Vandamme et al. 2006; Funke et al. 2010; Lawson et al. 2012). Foi também utilizada uma coleção de isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* (n=17) obtida de amostras de cavidade oral de cães diagnosticados com DP e pertencente ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Cunha et al. 2018). Estes isolados foram selecionados para este estudo considerando a sua associação com a DP na espécie canina, a sua representatividade nesta afeção e ainda serem característicos de diversas fases de evolução da mesma (Lawson et al. 2012; Holcombe et al. 2014; Polkowska et al. 2014; Wallis et al. 2015; Cunha et al. 2018).

Durante a realização deste projeto, os isolados foram mantidos em criotubos numa solução de água peptonada tamponada com 20% de glicerol, a -20°C e -80°C. Nos criotubos

correspondentes às espécies bacterianas anaeróbias foi ainda acrescentada uma camada de parafina estéril de forma a reforçar a ausência de oxigénio no meio de conservação.

Durante o estudo os isolados eram propagados em meios de enriquecimento inespecíficos. As bactérias aeróbias foram propagadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) com ou sem adição de agar (Brain heart infusion broth, VWR® Chemicals, ref. 84626.0500; Bacteriological agar, VWR® Chemicals, ref. 84609.0500)(figura 11) e posteriormente incubadas a 37°C durante 24h (figura 11A). Para propagação das bactérias anaeróbias foram utilizados os meios Chocolate Agar (Chocolate agar supplemented, VWR® Chemicals, ref. 101591ZF) (figura 12), Columbia Blood Agar (COS) (Columbia blood agar, VWR® Chemicals, ref. 100253ZF) (figura 13), Caldo de Brucella (Brucella broth, Liofilchem, ref. 610356) suplementado com hemina (5 µg/ml) (Hemin, Sigma-Aldrich, ref. 51280-1G) e vitamina K (10 µg/ml) (Vitamin K 1% Supplement, Liofilchem, ref.80053) (figura 14) e o meio Tryptic soy broth (TSB) (Tryptic soy broth, VWR® Chemicals, ref. 84675.0500) suplementado com glucose a 25% (D(+)-Glucose monohydrate, Merk KGaA, ref. 1.04074.0500). Estes foram, posteriormente, incubados em atmosfera de anaerobiose (Microbiology Anaerocult® A Mini, Merck KGaA, ref.1.01611.0001), a 37°C durante 48-72h.



**Figura 11 - Caracterização morfológica de *N. zoodegmatis* em meio de enriquecimento BHI agar**



Figura 12 - Caracterização morfológica de *P. canis* em meio de enriquecimento Chocolate agar

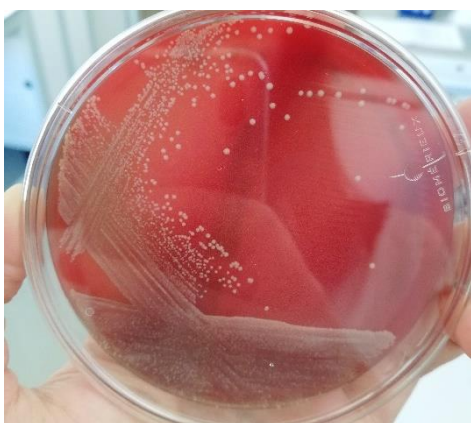


Figura 13 - Caracterização morfológica de *C. canis* em meio de enriquecimento COS

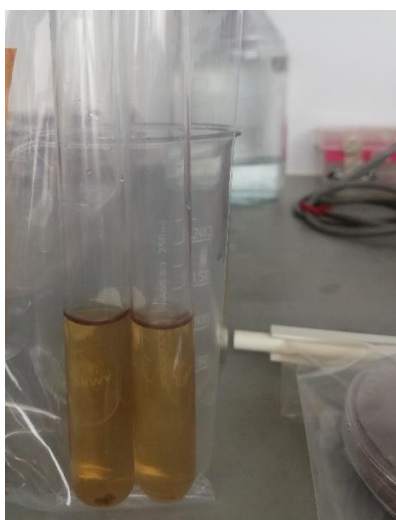


Figura 14 - Caracterização morfológica de *P. cangingivalis* em meio de enriquecimento Caldo de Brucella

## **2.2. Biogel antimicrobiano: nisina-biogel**

Para a preparação do biogel antimicrobiano foi inicialmente executada uma solução stock de nisina A com concentração de 40.000IU/mL (1000µg/mL). Esta solução foi preparada através da diluição de 1g de nisina A em pó (Nisin from *Lactococcus lactis* 2,5%, Sigma-Aldrich, ref. N5764-25G) em 25mL de Ácido Clorídrico (HCl) 0,02M (Merck, Hydrochloric acid fuming 37%, Alemanha). De seguida, a solução foi esterilizada por filtração através de um filtro de 0,22µm (Sterile Syringe Filter, Branchia, ref. SFCA-22E-050). A partir desta solução foram preparadas diluições sucessivas em água destilada estéril de forma a obter soluções com as seguintes concentrações de nisina: 1000, 750, 625, 500, 375, 250, 125, 50, 25 e 12,5 µg/mL. Estas soluções foram armazenadas a 4°C até à sua utilização (Santos et al. 2016; Cunha et al. 2018)

O gel de goma de guar foi preparado sob a forma de uma solução com concentração de 1,5% (w/v), através da diluição de 0,75g de goma de guar (Guar, Sigma-Aldrich, ref. G4129-500G) em 50mL de água destilada estéril, seguido de esterilização por autoclavagem durante 15 minutos a 121°C.

A incorporação da nisina no gel foi feita através da sua diluição numa proporção de 1:1, obtendo-se assim uma solução final de 0,75% (w/v), armazenadas a 4°C (Cunha et al. 2018).

## **2.3. Avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação bacteriana**

A avaliação da auto-agregação e co-agregação entre bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes teve como objetivo confirmar o potencial das estirpes selecionadas para a formação de biofilmes polimicrobianos (Katharios-Lanwermeier et al. 2014), bem como selecionar o isolado de *E. faecalis* da coleção disponível no Laboratório de Bacteriologia a utilizar nas restantes fases do projeto.

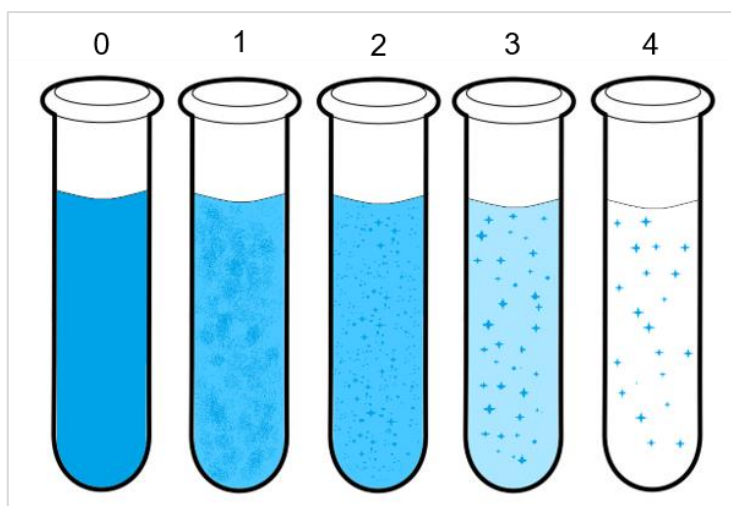
Para a avaliação da auto-agregação e co-agregação bacteriana foram utilizadas duas técnicas, uma baseada na avaliação visual (Sanguansermisri et al. 2018) e outra na análise espectrofotométrica da densidade ótica ("optical density" - OD) das suspensões bacterianas (Datta et al. 2017). Para tal, foram realizadas sementeiras em tapete no meio BHI agar, no caso das espécies aeróbias (*N. zoodegmatidis*, *E. faecalis* e *C. canis*), e em meios Chocolate agar e COS, no caso das espécies anaeróbias (*P. cangingivalis* e *P. canis*). Após incubação nas condições descritas anteriormente em 2.1. e confirmada a pureza das culturas, as culturas aeróbias foram inoculadas em 5mL de meio BHI líquido, e as culturas anaeróbias em 5mL de meio de caldo de Brucella suplementado, seguido de incubação nas mesmas condições.

Após incubação, as suspensões bacterianas em meio líquido foram centrifugadas a 5000g durante 7 minutos a 4°C (Universal High Speed Centrifuges, Hermle LaborTechnik, ref. Z 383 K), e o sobrenadante descartado. De seguida, foram adicionados 5mL de solução tampão de agregação (1 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8, 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> e 0.02% NaN<sub>3</sub>) ao precipitado, seguido de homogeneização através de um vortex. Por fim, a OD de todas as soluções a 600nm (OD<sub>600</sub>) foi ajustada para 1, o que corresponde a uma concentração bacteriana entre 2x10<sup>8</sup> e 7x10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>.

Para a avaliação visual da capacidade de auto-agregação pelas espécies foram retirados 2mL de cada suspensão bacteriana em tampão de agregação e posteriormente sujeitos a incubação em condições estáticas à temperatura ambiente por 2h. No caso da avaliação visual da capacidade de co-agregação bacteriana entre duas espécies diferentes, foi retirado 1mL de cada solução suspensão em tampão de agregação, posteriormente homogeneizados através de um vórtex durante 10 segundos e incubadas em condições estáticas à temperatura ambiente por 2h.

No final do período de incubação, a avaliação da capacidade auto-agregação e co-agregação bacteriana foi realizada visualmente com ajuda de uma fonte de luz e as suspensões classificadas numa escala de 0 a 4, conforme descrito por Sanguansermsi et al. em 2018 (figura 15), sendo que 0 caracteriza a ausência visual de agregação e 4 a ocorrência de agregação total entre bactérias.

- 0 = Sobrenadante com turvação uniforme e sem agregação bacteriana visível;
- 1 = Pequenos agregados bacterianos suspensos em sobrenadante turvo;
- 2 = Agregados bacterianos suspensos em sobrenadante turvo;
- 3 = Grandes agregados bacterianos suspensos em sobrenadante pouco turvo;
- 4 = Grandes agregados bacterianos com sobrenadante completamente limpo.



**Figura 15 - Esquema ilustrativo da escala de avaliação visual da capacidade de agregação bacteriana (original do autor)**

Para avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação através de análise espectrofotométrica, foram utilizados 2mL de suspensões bacterianas constituídas por apenas uma estirpe ou por duas estirpes. No caso das suspensões mistas, estas eram compostas por 1mL de cada uma das suspensões bacterianas. De seguida a OD<sub>600</sub> foi medida num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH, Alemanha) e o valor registado (OD1). A restante solução foi centrifugada a 650g durante 2 minutos a 4°C e deixada a incubar em condições estáticas a temperatura ambiente durante 2h e 24h, ao fim das quais, a OD<sub>600</sub> foi novamente medida e os valores registados como OD2 e OD24, respetivamente.

A percentagem de auto-agregação (entre culturas pertencentes à mesma espécie) e co-agregação (entre culturas pertencentes a espécies diferentes) foi determinada pela seguinte fórmula descrita por Datta et al. em 2017:

$$\% \text{ Agregação} = \frac{OD1 - OD2 \text{ (ou } OD24)}{OD1} \times 100$$

Admite-se a ocorrência de agregação em ensaios onde a percentagem determinada ultrapasse ou iguale os 30% (Datta *et al.* 2017).

Os ensaios foram repetidos três vezes em dias independentes e foi utilizada a média de resultados para o cálculo dos valores de agregação às 2h e às 24h.

#### **2.4. Estabelecimento de um modelo *in vitro* de biofilme polimicrobiano**

Para o estabelecimento de um biofilme polimicrobiano simulando a placa dentária canina, recorreu-se a um protocolo adaptado dos descritos por Vandeplassche et al. (2017) e Sanguansermisri et al. (2018).

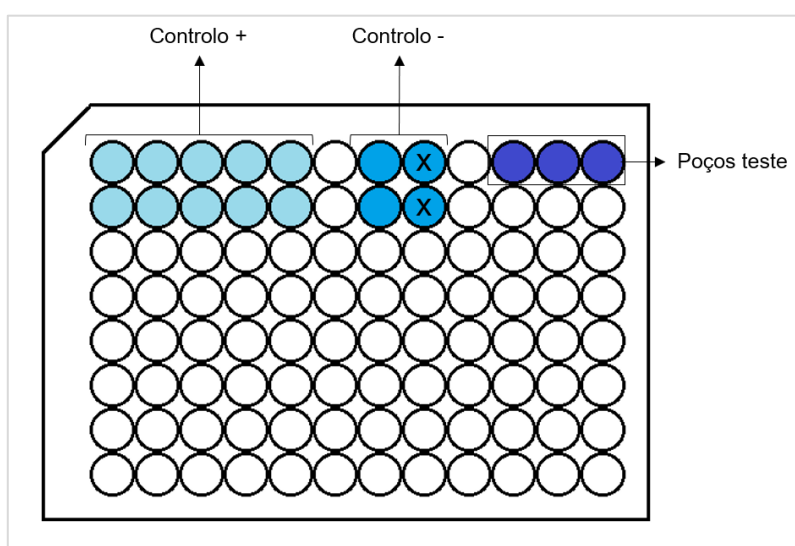
A estrutura física selecionada para o estabelecimento do biofilme polimicrobiano foi uma tampa de “pegs” de poliestireno (Nunc-TSP, Thermo Scientific, ref. 445497) utilizada como superfície de adesão bacteriana e desenvolvimento do biofilme e inserida numa microplaca de 96 poços (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, Thermo Scientific™, ref. 152038).

As tampas de “pegs” foram previamente incubadas durante duas horas em meio de saliva artificial canina (SAC) (1L de SAC contendo: 1g Lab Lemco Powder, 2g yeast extract, 5g proteose peptone, 2.5g hog gastric mucin, 2.34g NaCl, 1.5 g KCl, 0.1g CaCl<sub>2</sub> e 1.25 mL 40% ureia), de forma a simular o ambiente natural oral canino. Os poços de controlo negativo, indicados com um “x” na figura 16, não foram previamente incubados em meio CAS.

Durante este período, para cada um dos isolados, foram preparadas suspensões individuais bacterianas em NaCl 0,9% (Sodium chloride, Merck KGaA, ref. 1.06404.1000) estéril com um grau de turvação de 0,5 na escala de MacFarland (correspondendo

aproximadamente a  $10^8$ UFC/mL) a partir de culturas com 24h de incubação, seguidas de uma diluição de 1:10, em meio Caldo de Brucella, de forma a obter suspensões finais com  $10^7$ UFC/mL.

Estas suspensões foram distribuídas na microplaca de 96 poços, tal como indicado na figura 16. Nos poços correspondentes aos controlos positivos foram adicionados 200µL das suspensões bacterianas de cada espécie a incluir no biofilme polimicrobiano; nos correspondentes aos controlos negativos apenas foram colocados 200µL de meio de cultura utilizado; e nos poços teste foram adicionados 40 µL de cada uma das cinco suspensões bacterianas. Foram utilizados dois tipos de controlos negativos, um com incubação prévia dos “pegs” em meio SAC e outro sem incubação prévia em meio SAC (figura 16).



**Figura 16 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor)**

Legenda: x – poços de controlo negativo correspondentes aos “pegs” sem incubação prévia em meio SAC

Em seguida, as tampas de “pegs” incubadas em SAC, foram colocadas na microplaca, posteriormente incubada a 37°C durante 48h em ambiente de microaerofilia (Microbiology Anaerocult® C mini, Merck KGaA, ref. 1.13682.0001).

Após 48h de incubação, a tampa de “pegs” foi retirada e lavada três vezes durante 30 segundos numa solução de NaCl 0,9%, de forma a remover as bactérias que não aderiram aos “pegs”. De seguida, a tampa foi colocada numa outra microplaca de 96 poços, previamente preenchida com 200µL de meio Caldo de Brucella. Esta nova placa foi isolada e incubada num banho de ultrassons (Gramt, Ultrasonic Bath, MXB14), numa frequência alta (50–60 Hz) durante 15 minutos a 37°C de forma a promover a libertação dos biofilmes formados nos “pegs”.



De seguida, foram retirados 10ul de cada poço da microplaca e colocados em lâminas de teflon (Diagnostic Microscope Slides, Thermo Scientific, ref. ER-308B-CE24). A confirmação da presença das cinco estirpes bacterianas no biofilme polimicrobiano foi realizada através da técnica FISH.

## **2.5. Caracterização do biofilme polimicrobiano pela técnica Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)**

A técnica FISH realizada neste passo foi desenvolvida e testada pela equipa de investigação do Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (Oliveira et al. 2006).

A técnica FISH é uma técnica molecular que permite a deteção de bactérias através da hibridização de uma sonda específica, marcada com um fluorocromo, a uma sequência genómica característica de um microrganismo. A ligação da sonda ao microrganismo pode ser avaliada através da observação da frequência de luz emitida pelo fluorocromo, num microscópio de fluorescência.

Esta técnica divide-se em quatro etapas: fixação e permeabilização das células bacterianas, lavagens de estringência, hibridação da sonda e da sequência alvo e visualização imediata ao microscópio (Oliveira et al. 2004).

Assim sendo, em primeiro lugar foi seleccionada uma sonda específica para cada espécie bacteriana presente no biofilme polimicrobiano. Foram utilizadas cinco sondas dirigidas para o 16s rARN, marcadas com um fluorocromo na sua extremidade 5' (STABvida, Caparica, Portugal) (figura17). Na tabela 3 encontram-se descritas as características de cada sonda, nomeadamente a sequência nucleotídica, Temperatura de Melting e o fluorocromo utilizado para marcação.

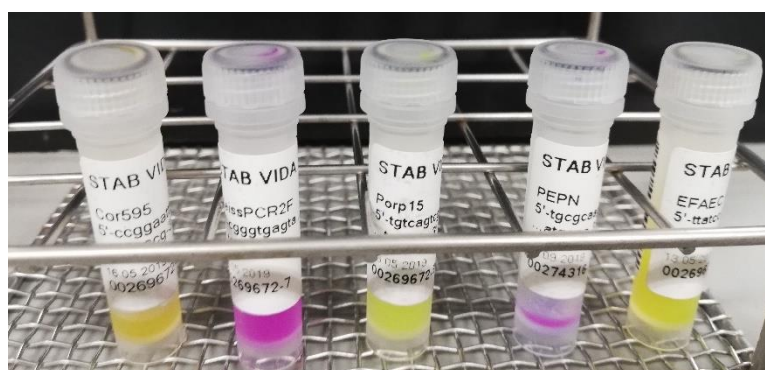
Antes de se proceder à avaliação da composição bacteriana dos biofilmes formados, foi necessário confirmar a especificidade de cada uma das sondas seleccionadas, de forma a garantir que estas se ligavam especificamente à estirpe bacteriana alvo sem ocorrência de reações cruzadas com as restantes espécies bacterianas.

Assim, a partir de culturas em meio líquido com 24h de incubação, suspensões individuais bacterianas com um grau de turvação de 0,5 na escala de MacFarland foram preparadas em NaCl 0,9%. Posteriormente, estas suspensões foram distribuídas nos poços de lâminas de teflon (10µL/poço) deixadas à temperatura ambiente até se encontrarem secas (figura 18).

**Tabela 3 – Descrição das características das sondas utilizadas para cada espécie bacteriana alvo**

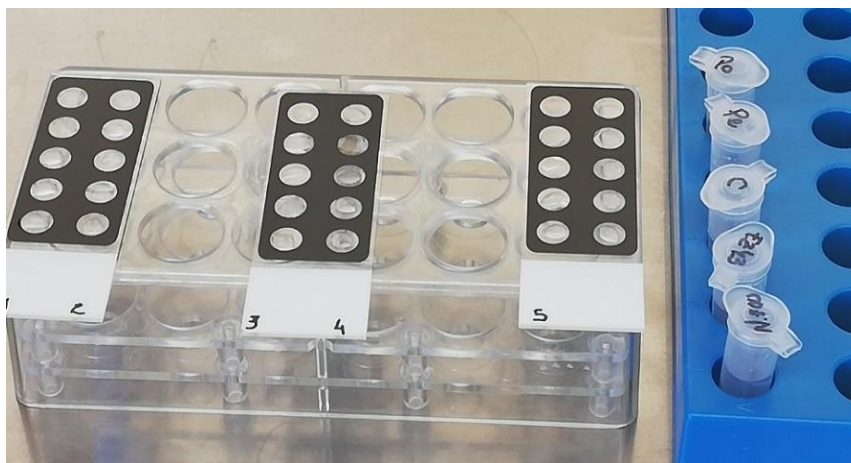
Designação de sonda	Espécie alvo bacteriana	Sequência	T <sub>m</sub>	FI	Ref.
<b>NEISSPCR2F</b>	<i>Nesseria sp.</i>	5'-CGGGTGAGTAACATATCGG-3'	51,1°C (46°C)	Rod	(Walche r et al. 2013)
<b>EFAEC</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	5'-TTATCCCCCTCTGATGGG-3'	50,3°C (46°C)	Fluo	(da Costa et al. 2007)
<b>COR595</b>	<i>Corynebacterium sp.</i>	5'-CCGGAATTTACAGACGACG-3'	53,8°C (48°C)	Fluo	(Mark Welch et al. 2016)
<b>PORP15</b>	<i>Porphyromonas sp.</i>	5'-TGTCAGTCGCAGTATGGCAA-3'	51,8°C (46°C)	Fluo	(Alm et al. 1996)
<b>PEPN</b>	<i>Peptoniphilus sp.</i>	5'-TGCGCAAGCATGAAA-3'	39,2°C (35°C)	Rod	(Song et al. 2003)

Legenda: T<sub>m</sub> – Temperatura de Melting: temperatura à qual metade da sequência de bases de determinada molécula de ARN está desnaturada. Entre parênteses encontramos a temperatura de hibridação, temperatura à qual ocorre a ligação da sonda ao ARN do microrganismo e descrita como aproximadamente 5°C inferior à temperatura de melting; FI – Fluorocromo; Rod – Rodamina; Fluo – Fluoresceína.



**Figura 17 - Soluções stock de cada uma das cinco sondas utilizadas para cada espécie bacteriana alvo**

Legenda: da esquerda para a direita - Cor595, NeissPCR2F, Porp15, PEPN e EFAEC



**Figura 18 - Distribuição das diferentes suspensões individuais bacterianas nos poços de lâminas de teflon, para confirmação da especificidade de cada uma das sondas selecionadas (original do autor)**

Legenda: À direita, os eppendorfs com as suspensões individuais das 5 estirpes bacterianas utilizadas.

Posteriormente, as suspensões foram fixadas com 20 $\mu$ L de paraformaldeído a 4% (Paraformaldehyde power, Sigma – Aldrich, ref. S41096-437) à temperatura ambiente durante 4h.

Em seguida, na fase da desidratação, as lâminas foram lavadas em etanol (Etanol 96% vol., AGA – Álcool e géneros alimentares, ref. E.F.PT 50072745701) a 50, 80 e 96%, durante 3 minutos em cada concentração, seguido de permeabilização com 0,05 $\mu$ L lisozima (Lysozyme, Merk KGaA, ref. 1.05281.0010) durante 20 minutos.

Após uma nova etapa de desidratação em etanol, foram adicionados a cada poço 10 $\mu$ L de uma de cinco soluções de tampão de hibridação (0.9 M NaCl, 20 mM Tris–HCl pH 7.2, 0.01% SDS), cada uma contendo 5ng/ $\mu$ L de cada uma das sondas a ser avaliada. Em seguida, as lâminas foram incubadas numa câmara húmida (Omnislide Thermal Cycling Block, Hybaid Omnislide System, Thermoelectron Corporation, USA) à temperatura específica para cada sonda – temperatura de hibridação, durante 3h (tabela 3).

No final da incubação, as lâminas foram lavadas em tampão de lavagem (0.9 M NaCl, 20 mM Tris–HCl pH 7.2, 0.1% SDS) durante 15 minutos à mesma temperatura utilizada durante a incubação – temperatura de hibridação.

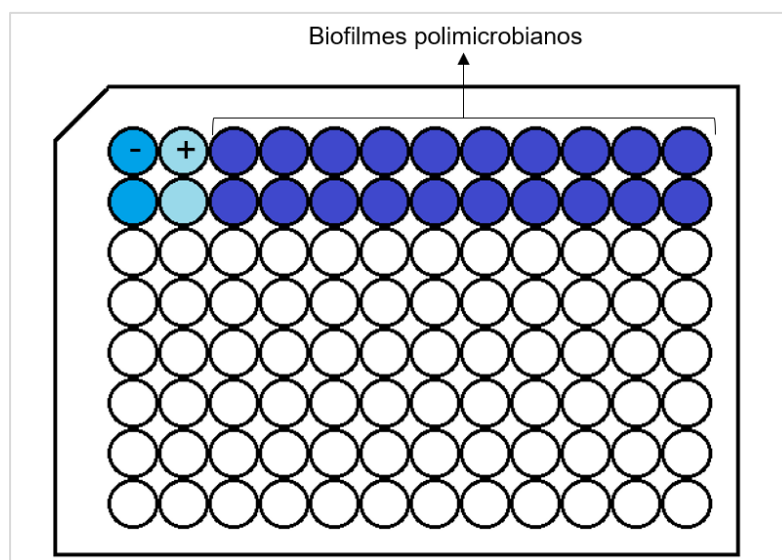
Por fim, as lâminas foram montadas em meio Vectashiled (Vectashiled vibrance antifade mounting medium c/ DAPI, Vector Laboratories, ref. VCH-1800-2) e analisadas através de um microscópio de fluorescência, equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100W, um filtro I3 para excitação entre 450 e 490 nm e um filtro aN2.1 para excitação entre 515 e 560 nm com uma objetiva de 1000x (objetiva HCX PLAN APD) num microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Lda., Lisboa, Portugal).

A avaliação da composição bacteriana dos biofilmes formados foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito para a confirmação da especificidade das sondas e utilizando as lâminas formadas no ponto 2.4..

## **2.6. Avaliação do potencial antimicrobiano do biogel de nisina relativamente a um biofilme polimicrobiano - determinação da concentração mínima inibitória (CMIB) e de erradicação (CMEB) de biofilme**

Para a determinação da CMIB e da CMEB do biogel antimicrobiano foi utilizada a técnica de microdiluição em placa, através de um protocolo adaptado dos previamente descritos por Tremblay et al. em 2014, Santos et al. em 2016 e Cunha et al. em 2018.

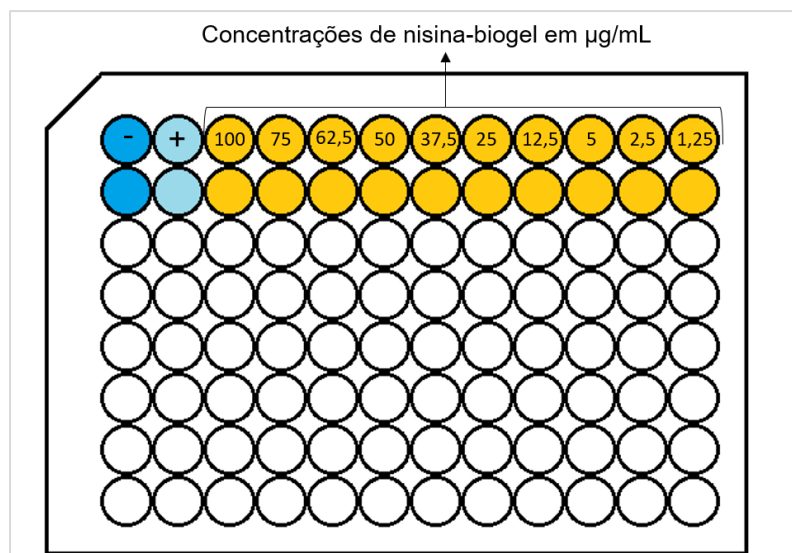
Em primeiro lugar, biofilmes polimicrobianos compostos pelas espécies selecionadas foram estabelecidos em placas de 96 poços com tampa de “pegs”, tal como descrito anteriormente no ponto 2.4. e de acordo com o esquema apresentado na figura 19.



**Figura 19 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor)**

Legenda: + controlo positivo; - controlo negativo.

Após incubação durante 48h em condições de microaerofilia, a tampa de “pegs” foi retirada e lavada três vezes durante 30 segundos numa solução de NaCl 0,9%. De seguida, esta tampa foi colocada numa nova placa cujos poços foram previamente preenchidos com 160µL de meio Caldo de Brucella e 40µL de nisina-biogel com concentrações variáveis entre 1,25 e 100µg/mL, como ilustrado na figura 20. Esta nova placa foi incubada durante 24h a 37°C em condições de microaerofilia.



**Figura 20 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CMIB e CMEB da solução de gel de goma de guar suplementada com nisina (original do autor)**

Legenda: + controlo positivo; - controlo negativo.

Após incubação, a CMIB do biogel de nisina foi determinada visualmente como a concentração mais baixa a inibir a multiplicação bacteriano e, consequentemente, a formação de biofilme. A CMIB foi ainda confirmada pela determinação da OD das suspensões presentes em cada poço a 570nm e 600nm.

Posteriormente, a tampa de “pegs” da microplaca foi lavada três vezes durante 30 segundos numa solução de NaCl 0,9%, de forma a remover as bactérias que não aderiram aos “pegs”. De seguida, a tampa foi colocada numa segunda microplaca de 96 poços, previamente preenchida com 200µL de meio Caldo de Brucella. Esta nova placa foi isolada e incubada num banho de ultrassons (Gramt, Ultrasonic Bath, MXB14) numa frequência alta (50–60 Hz), durante 15minutos a 37°C, de forma a promover a libertação dos biofilmes formados nos “pegs”. De seguida, a tampa de “pegs” foi descartada e substituída por uma tampa sem “pegs”, e a microplaca foi incubada durante 48h a 37°C em condições de microaerofilia.

No final deste período, a CMEB foi determinada visualmente e por quantificação da OD das suspensões bacterianas de cada poço a 570nm e 600nm. Adicionalmente, a presença das cinco espécies bacterianas nos biofilmes polimicrobianos estabelecidos inicialmente foi confirmada através da técnica FISH, tal como descrito anteriormente no ponto 2. 5..

### 3. Resultados e discussão

Nos últimos anos tem ocorrido uma grande evolução no estudo do desenvolvimento da DP canina, assim como de novas formas para o seu tratamento e prevenção.

A DP resulta da ação de biofilmes polimicrobianos, formados na superfície dentária, e consequente interação com o sistema inflamatório do hospedeiro, provocando uma série de

alterações que levam à destruição dos tecidos periodontais (Albuquerque et al. 2012). Desta forma, um dos grandes objetivos atuais da investigação nesta área passa por uma melhor compreensão das características dos biofilmes dentários, incluindo estudos das espécies bacterianas constituintes dos mesmos e da sua suscetibilidade após exposição a diversas substâncias antimicrobianas, como é o caso da nisina.

As espécies bacterianas incluídas neste projeto foram selecionadas com base em diversos estudos que avaliaram a microbiota oral canina associada a DP (Lawson et al. 2012; Holcombe et al. 2014; Polkowska et al. 2014; Wallis et al. 2015; Cunha et al. 2018). Estes estudos descrevem um papel específico de alguns géneros bacterianos, nomeadamente *Neisseria* e *Corynebacterium*, descrevendo-os como principais responsáveis pela adesão inicial à superfície dentária e pela criação de locais de ligação para outras bactérias. Assim, a escolha das espécies *N. zoodegmatis* e *C. canis* teve como objetivo a inclusão no estudo de duas espécies bacterianas descritas como colonizadores primários durante a formação do biofilme dentário. A espécie *P. cangingivalis* está descrita como uma das espécies mais abundantes na cavidade oral canina, estando presente durante o desenvolvimento da DP, sendo por isso relevante a sua inclusão neste estudo (Holcombe et al. 2014; Wallis et al. 2015). Relativamente à espécie *P. canis*, esta foi frequentemente identificada como presente em fases avançadas da DP canina, contribuindo assim enquanto colonizador secundário durante a formação de biofilmes (Davis et al. 2013; Wallis et al. 2015). A escolha de inclusão de um isolado de *E. faecalis* neste estudo deveu-se não só à descrição da sua presença na cavidade oral de cães diagnosticados com DP, como também à sua forte associação com o desenvolvimento de doenças sistémicas associadas, mais concretamente endocardite infecciosa canina. A associação previamente estabelecida entre estas duas doenças vem reforçar a importância atribuída ao estudo do desenvolvimento e controlo de biofilmes dentários enquanto possíveis fatores contribuintes aos aparecimento de outras doenças sistémicas (Semedo-Lemsaddek et al. 2016).

Sendo um dos principais objetivos deste projeto a avaliação do potencial antimicrobiano da nisina incorporada no biogel de goma de guar relativamente a um biofilme polimicrobiano, a escolha destas espécies contribuiu para a criação de um modelo de biofilme mais próximo do descrito na DP canina.

### **3.1. Avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação bacteriana**

Os processos de auto-agregação e co-agregação bacteriana estão descritos como presentes a partir da segunda fase de formação dos biofilmes dentários. Estes processos são responsáveis pela ligação entre bactérias pertencentes à mesma espécie e a espécies

diferentes, permitindo o desenvolvimento de comunidades polimicrobianas responsáveis pela produção de polissacáridos extracelulares (Rickard et al. 2003).

A avaliação da capacidade de auto-agregação e co-agregação foi realizada com recurso a duas técnicas adaptadas, uma baseada na avaliação visual das culturas e outra na análise espectrofotométrica da sua OD.

O primeiro objetivo desta avaliação foi a comparação do potencial de agregação entre os 17 isolados de *E. faecalis* da coleção de DP disponível no Laboratório de Bacteriologia e as estirpes aeróbias utilizadas neste projeto, *N. zoodegmatis* e *C. canis*. Esta comparação teve como finalidade a selecção do isolado de *Enterococcus* sp. com maior potencial de agregação de forma a integrar a coleção de bactérias utilizadas durante as seguintes fases do projeto. Os resultados estão descritos na tabela 4:

**Tabela 4 - Avaliação do potencial de co-agregação bacteriana entre os 17 isolados de *E. faecalis* e as estirpes aeróbias *N. zoodegmatis* e *C. canis*, por avaliação visual e espectrofotométrica**

<b>Código de isolados de <i>E. faecalis</i></b>	<b><i>Neisseria zoodegmatis</i></b>			<b><i>Corynebacterium canis</i></b>		
	Avaliação visual	Avaliação espectrofotométrica		Avaliação visual	Avaliação espectrofotométrica	
		%2h	%24h		%2h	%24h
<b>EZB2b</b>	1	30,66	55,98	2	8,01	1,07
<b>EZB2c</b>	1	7,05	34,57	2	-0,67	16,54
<b>EZB3b</b>	1	4,30	31,14	2	6,28	37,80
<b>EZB3d</b>	1	-0,09	16,81	2	13,54	2,21
<b>EZB4a</b>	1	5,89	14,69	2	23,91	5,95
<b>EZB4c</b>	1	44,81	36,03	2	26,78	36,19
<b>EZB15b</b>	1	12,32	39,44	2	24,34	61,74
<b>EZB15d</b>	1	12,09	40,20	2	26,98	39,44
<b>EZB21a</b>	1	7,43	13,69	2	12,26	18,73
<b>EZB21c</b>	0	1,71	36,61	2	-13,79	40,86
<b>EZB23a</b>	2	8,53	34,82	2	20,28	24,28
<b>EZB23c</b>	1	5,94	40,59	2	24,69	22,47
<b>EZB25a</b>	2	9,98	42,28	2	9,51	37,84
<b>EZB25c</b>	1	4,14	36,61	2	-3,59	33,03
<b>EZB29b</b>	2	44,71	40,48	2	3,94	38,79
<b>EZB32a</b>	2	19,65	47,75	2	27,42	49,15
<b>EZB32b</b>	1	-3,77	21,79	2	3,03	7,42

Através da análise dos resultados foi possível excluir em primeiro lugar os isolados que não apresentavam potencial de co-agregação após avaliação visual (EZB21c), e os que apresentavam valores negativos (EZB2c, EZB3d, EZB21c, EZB25c e EZB32b), ou uma percentagem de co-agregação inferior a 30% às 2h e às 24h após avaliação espectrofotométrica (EZB2b, EZB4a, EZB21a, EZB23a e EZB23c). Os restantes isolados encontram-se assinalados a azul na tabela 4.

Para a segunda etapa do projeto foi selecionado o isolado que apresentava valores de co-agregação mais elevados em relação às duas espécies bacterianas aeróbias em estudo, tendo em consideração o objetivo final de formação de um biofilme polimicrobiano, e avaliação da CMIB e CMEB do biogel de nisina relativamente ao mesmo. Assim, foram excluídos todos os isolados que apresentavam uma diminuição na percentagem de co-agregação entre as 2h e as 24h após avaliação espectrofotométrica, uma vez que uma diminuição na taxa de co-agregação ao longo do tempo poderia influenciar negativamente os resultados futuros. Os resultados de avaliação visual, permitiram excluir os isolados com classificação menor que 2 em qualquer um dos ensaios.

Assim, foi possível concluir que os isolados EZB32a e EZB25a apresentavam as melhores características, sendo o isolado EZB32a considerado para as restantes fases do projeto por apresentar valores superiores de agregação às 2h e às 24h. A partir deste ponto este isolado será apenas referido através da designação de espécie *E. faecalis*.

De seguida, foi realizada a avaliação da capacidade de co-agregação e auto-agregação entre todas as espécies bacterianas envolvidas neste projeto. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 5.

Através da análise da tabela podemos concluir que todas as espécies bacterianas, à exceção de *E. faecalis*, apresentam capacidade de auto-agregação e co-agregação às 2h e/ou às 24h.

A espécie bacteriana com maior capacidade de auto-agregação é *C. canis*, com índice de 3 (agregados bacterianos de grande dimensão suspensos em sobrenadante pouco turvo) após avaliação visual e valores superiores a 80% às 2h e às 24h após avaliação espectrofotométrica. Esta elevada capacidade de agregação por parte da espécie *C. canis* é também visível quando comparados os resultados da co-agregação entre pares que envolvem esta espécie e pares envolvendo outras espécies que não *C. canis*, já que os primeiros foram os únicos a apresentar co-agregação às 2h e 24h na avaliação por análise espectrofotométrica e todos apresentaram índice de 2 (agregados bacterianos suspensos em sobrenadante turvo) na avaliação visual.

A espécie *E. faecalis* foi a única a não apresentar valores indicativos de auto-agregação às 2h e às 24h por análise espectrofotométrica, apesar de se encontrar perto do valor mínimo (30%) na avaliação às 24h, com uma percentagem de 28,94%. Esta espécie



apresentou também um índice baixo de auto-agregação após avaliação visual, na qual foram apenas visíveis agregados bacterianos de pequenas dimensões suspensos em sobrenadante turvo (=1). Esta espécie apresentou, no entanto, elevadas percentagens de co-agregação relativamente às restantes espécies bacterianas em estudo.

**Tabela 5 - Avaliação do potencial de auto-agregação e co-agregação entre todas as espécies bacterianas envolvidas no projeto por avaliação visual e espectrofotométrica**

Espécies bacterianas	Avaliação visual	Avaliação espectrofotométrica	
		%2h	%24h
<i>N. zoodegmatis</i>	1	7,07	33,27
<i>N. zoodegmatis</i> + <i>E. faecalis</i>	1	10,10	31,91
<i>N. zoodegmatis</i> + <i>C. canis</i>	2	48,99	59,12
<i>N. zoodegmatis</i> + <i>P. canis</i>	2	18,06	48,79
<i>N. zoodegmatis</i> + <i>P. cangingivalis</i>	1	16,57	46,47
<i>E. faecalis</i>	1	6,82	28,94
<i>E. faecalis</i> + <i>C. canis</i>	2	35,57	60,02
<i>E. faecalis</i> + <i>P. canis</i>	1	9,00	42,33
<i>E. faecalis</i> + <i>P. cangingivalis</i>	1	16,77	46,24
<i>C. canis</i>	3	83,74	82,42
<i>C. canis</i> + <i>P. canis</i>	2	43,14	62,77
<i>C. canis</i> + <i>P. cangingivalis</i>	2	46,58	60,24
<i>P. canis</i>	1	24,48	49,37
<i>P. canis</i> + <i>P. cangingivalis</i>	1	25,27	59,25
<i>P. cangingivalis</i>	2	14,31	45,09

Como já foi referido, os géneros *Corynebacterium* e *Neisseria* são uns dos mais frequentemente identificados enquanto colonizadores primários durante os processos de formação de biofilmes bacterianos dentários (Holcombe et al. 2014). Estes géneros são responsáveis pela adesão inicial bacteriana à película formada na superfície dentária durante a primeira fase de desenvolvimento de biofilme, assim como pela adesão de colonizadores secundários e terciários nas restantes fases de desenvolvimento do mesmo, através de processos de auto-agregação e co-agregação (Huang et al. 2011). Desta forma, os resultados obtidos durante a avaliação da co-agregação entre as espécies *N. zoodegmatis* e *C. canis* e as restantes em estudo indicam que estas espécies apresentam capacidade de formação de biofilmes múltiplos, particularmente *C. canis*, o que representa uma vantagem para a fase

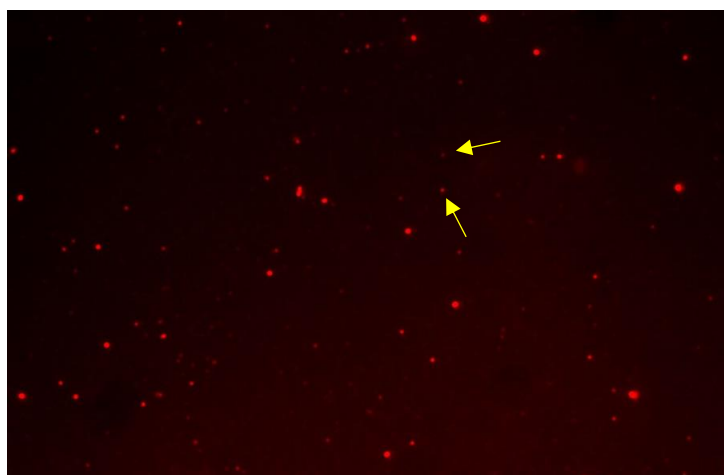
seguinte do projeto, que consiste na formação de um biofilme polimicrobiano constituído pelas cinco espécies bacterianas já mencionadas.

### **3.2. Caracterização do biofilme polimicrobiano pela técnica Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)**

A confirmação da presença das cinco espécies bacterianas no biofilme polimicrobiano foi realizada pela técnica FISH, previamente desenvolvida e testada (Oliveira et al. 2006).

Durante a avaliação da especificidade das sondas selecionadas não se verificaram reações de hibridação cruzadas entre as sondas específicas e as diferentes espécies bacterianas, apresentando cada uma das reações específicas um sinal de hibridação forte.

Através da observação direta ao microscópio de fluorescência foi possível confirmar a presença das cinco espécies bacterianas em estudo no biofilme polimicrobiano, através da metodologia apresentada em 2.4. (figuras 21 a 25). Estes resultados confirmam os resultados obtidos durante a avaliação da capacidade de co-agregação e auto-agregação entre as bactérias em estudo.



**Figura 21 - Visualização de *N. zoodegmatis* (setas a amarelo) presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella (original do autor)**

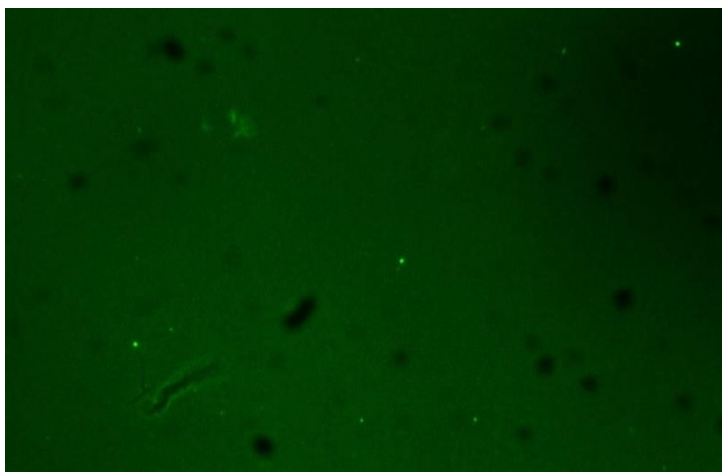


Figura 22 - Visualização de *C. canis* presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella (original do autor)



Figura 23 - Visualização de *E. faecalis* presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella (original do autor)

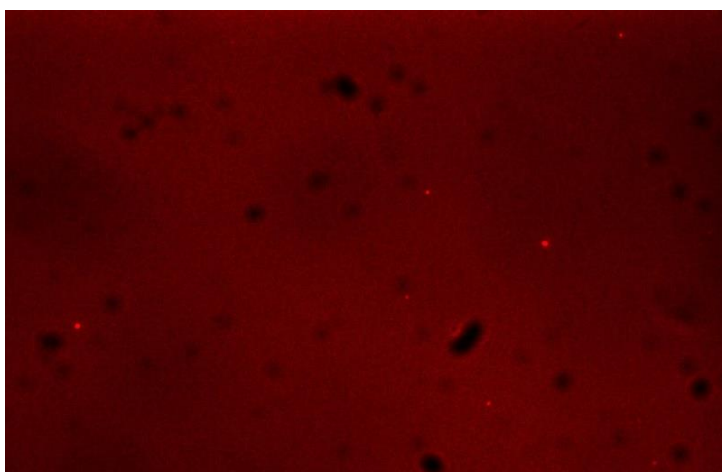
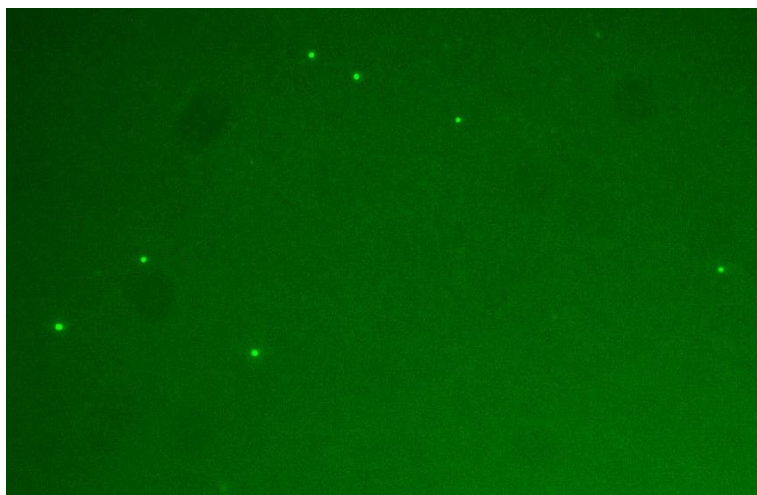


Figura 24 - Visualização de *P. canis* presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella (original do autor)



**Figura 25 - Visualização de *P. cangingivalis* presente no biofilme polimicrobiano após hibridação de suspensões em meio brucella (original do autor)**

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos diversos estudos com vista ao controlo e tratamento de biofilmes dentários, através da tentativa de mimetização destas comunidades polimicrobianas em modelos *in vitro* (Sherry et al. 2016). No entanto, a grande maioria destes modelos tende a incluir um número muito limitado de espécies bacterianas, nem sempre representativas das espécies presentes durante o desenvolvimento da DP, e que tornam difícil a análise crítica dos resultados obtidos durante os estudos (Sherry et al. 2016; Cunha et al. 2018; Sanguanserm Sri et al. 2018). Amostras de placa bacteriana recolhidas diretamente de doentes têm também sido utilizadas como meio de formação de biofilmes mais próximos do observado *in vivo*. No entanto, a grande maioria destes estudos não permitem uma identificação clara das espécies bacterianas envolvidas, dependendo a sua presença do ambiente oral de cada indivíduo, tornando a descrição detalhada do biofilme formado praticamente impossível assim como a reprodutibilidade futura do estudo (Wang et al. 2015; Sherry et al. 2016).

No presente estudo foram formados biofilmes polimicrobianos dentários incluindo cinco espécies bacterianas com importância estabelecida nas diversas fases do desenvolvimento destas comunidades polimicrobianas, mimetizando o melhor possível o que se observa *in vivo* numa placa canina, e cuja presença foi confirmada pela técnica FISH. A utilização de estirpes de referência destas espécies e a aplicação de técnicas de identificação bacteriana específicas para estas espécies, permite não só garantir a sua presença em todas as fases do projeto, bem como a reprodutibilidade do ensaio por outras equipas de investigação.

É também importante referir que a incubação da tampa de “pegs”, que serviu de suporte físico à formação do biofilme, em meio SAC, previamente à formação do biofilme, foi

realizada com o objetivo de mimetizar a película que inicialmente se forma na superfície dentária, e consequentemente o ambiente que se observa na cavidade oral canina *in vivo*.

A composição da solução de SAC utilizada neste protocolo foi adaptada da descrita por Elliott em 2005, incluindo alterações ao nível do valor de pH e conteúdo de sais, de forma a obter um composto estável e reproduzível onde valores se aproximassem do observado na cavidade oral canina. Elliot utilizou esta solução como meio de multiplicação bacteriana em modelos da placa dentária canina, com vista à formação de um biofilme polimicrobiano dentário, tal como efetuado neste estudo (Elliott 2005).

A utilização da técnica FISH permitiu a visualização direta das bactérias presentes na amostra, podendo ser comparada às técnicas convencionais de coloração em lâmina, sendo uma técnica rápida, sensível e pouco dispendiosa e que permitiu a caracterização do biofilme polimicrobiano (Oliveira 2005).

Comparativamente a outras técnicas moleculares de deteção de microrganismos, a técnica FISH apresenta a vantagem de utilizar a molécula de rARN como alvo. O rARN, ao contrário do ADN que possui apenas uma cópia única na célula, apresenta cerca de  $10^4$  cópias na célula bacteriana, o que permite aumentar a sensibilidade da sua deteção em cerca de 1000 a 5000 vezes (Oliveira 2005). O rARN pode ser encontrado em todos os organismos vivos, é relativamente estável e está também presente em forma de cadeia simples, eliminando a necessidade de introduzir um passo de desnaturação no protocolo (Oliveira 2005). Em comparação, a utilização de técnicas para deteção da presença das bactérias baseadas na molécula de ADN não permite a diferenciação entre bactérias vivas ou mortas, não permitindo assim garantir a sua presença de forma viável no biofilme (Soares et al. 2015; Magana et al. 2018).

A utilização de modelos *in vitro* de biofilmes polimicrobianos representa uma forma eficaz e objetiva do estudo de afeções como a DP canina, na medida em que permite a testagem de novas formas de prevenir a sua formação e desenvolvimento, revelando novas informações sobre o combate a estas doenças (Pratten et al. 1998).

De facto, através da formação de uma matriz envolvente composta por glicoproteínas salivares, lípidos, detritos celulares e polissacáridos extracelulares, as bactérias presentes no biofilme tornam-se menos suscetíveis à ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo à ação mecânica da saliva, sendo esta resistência proporcional ao nível de maturação do biofilme (Strempe et al. 2014). A aplicação de antibióticos no tratamento da DP é também considerada um desafio visto que as bactérias organizadas sob a forma de biofilme apresentam um nível de resistência cerca de 1000-1500 vezes superior comparativamente às suas formas planctónicas (Teughels et al. 2018). Exemplos de mecanismos de resistência que ocorrem nos biofilmes são a alteração de locais de ligação de AB e a destruição enzimática dos mesmos (Huang et al. 2011; Strempe et al. 2014; Vandeplassche et al. 2017). Os

biofilmes são também responsáveis pela criação de condições que levam à multiplicação de espécies anaeróbias estritas em ambientes aeróbios após consumo de oxigênio pelas espécies aeróbias constituintes dos biofilmes, que representam os colonizadores iniciais dos mesmos (Huang et al. 2011).

Este estudo permitiu o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de um biofilme polimicrobiano constituído por cinco espécies bacterianas, incluindo espécies aeróbias e anaeróbias, representativas das diferentes fases de evolução da DP canina.

Este modelo poderá servir de modelo padrão em estudos futuros. Nesse sentido, todas as suas fases foram realizadas em ambiente laboratorial estável e baseadas num protocolo pré-definido. Através da utilização de estirpes bacterianas de referência, meios de cultura disponíveis comercialmente e condições de multiplicação bacteriana conhecidas, nomeadamente de temperatura e oxigenação controlada, este modelo poderá ser novamente reproduzido por outros estudos, bem como servir de base ao desenvolvimento e avaliação de outros compostos antimicrobianos com vista à prevenção da DP canina.

### **3.3. Avaliação do potencial antimicrobiano do biogel de nisina relativamente a um biofilme polimicrobiano - determinação da concentração mínima inibitória (CMIB) e de erradicação (CMEB) de biofilme**

A utilização de péptidos antimicrobianos tem sido investigada nos últimos anos enquanto método alternativo ao uso de AB, para aplicação no controlo da formação de biofilmes e destruição de biofilmes previamente formados (Gorr and Abdolhosseini 2011). Para além da sua ação contra agentes patogénicos, os péptidos antimicrobianos atuam também enquanto moduladores do sistema imunitário, através da sua capacidade de promover a libertação de células de defesa pelo hospedeiro, como os linfócitos e citoquinas anti-inflamatórias (Batoni et al. 2016; Santos et al. 2016).

A nisina é um dos péptidos antimicrobianos mais bem estudados e caracterizados, sendo pertencente ao grupo dos lantibióticos. Esta possui um espectro de ação alargado, incluindo bactérias gram-positivas e algumas gram-negativas e baixa citotoxicidade. Este péptido apresenta também baixa probabilidade de desenvolvimento de resistências, uma vez que atua principalmente ao nível da membrana citoplasmática através da formação de poros que levam à morte celular (Tong et al. 2010; Field et al. 2015; Shin et al. 2016).

Em 2010, estudos realizados por Tong et al. demonstraram o efeito da nisina enquanto inibidor da multiplicação de bactérias associadas ao aparecimento de cáries em humanos (bactérias cariogénicas), tais como *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e

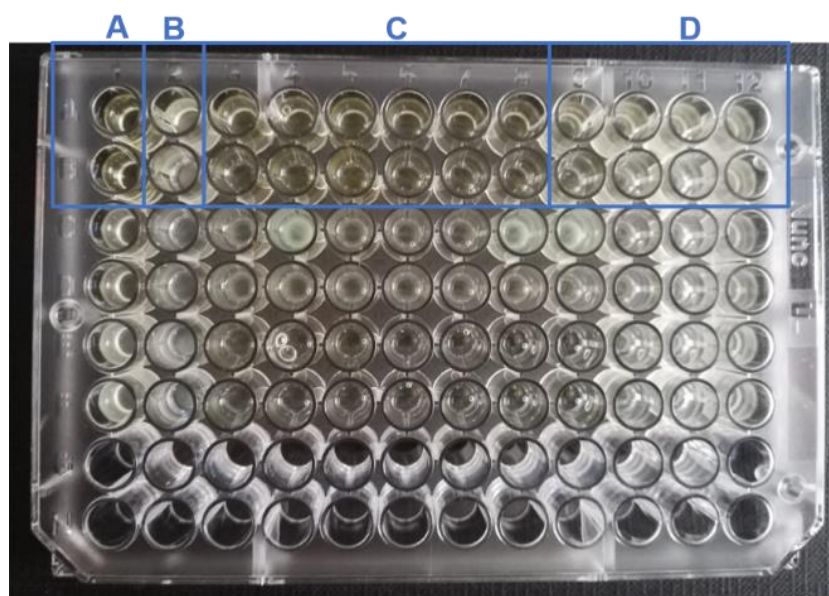
*L. fermenti*. Neste mesmo estudo, foi ainda testada a influência da saliva na atividade antimicrobiana da nisina. Neste estudo, a comparação entre a concentração mínima inibitória (CMI) de uma solução de nisina diluída em saliva e de uma solução de nisina diluída num tampão isotónico (PBS) não revelou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os resultados (Tong et al. 2010). Mais tarde, em 2015, Shin et al. demonstraram a atividade inibitória da nisina em relação a bactérias gram-positivas (*Streptococcus gordonii* e *S. oralis*) e gram-negativas (*Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*), obtendo valores de CMI entre os 2.5 e os 50 µg/ml. A atividade da nisina em relação a biofilmes polimicrobianos também foi analisada, verificando-se a sua capacidade de inibição de formação e de erradicação dos mesmos (Shin et al. 2015).

A utilização do gel de goma de guar representa um veículo de administração de nisina capaz de evitar a sua degradação antes de atingir o seu alvo. Este gel apresenta baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade numa larga gama de valores de pH, grande disponibilidade na natureza e baixo preço (Reddy et al. 2011; Santos et al. 2016; Thombare et al. 2016; Trovão 2017).

Em 2018, Cunha et al. testaram os efeitos inibitórios de um biogel de nisina em relação a biofilmes monoespécie constituídos por cada um dos 17 isolados de *enterococci* testados no ponto 3.1. deste estudo. Todos os isolados foram considerados suscetíveis ao biogel suplementado com nisina, que apresentou valores de CMIB entre os 5.75 e os 23.00 µg/mL e de CMEB entre 6.50 e 68.75 µg/mL. O valor de CMIB em relação ao isolado utilizado neste projeto foi de 5,75 µg/mL e de CMEB de 12,50 µg/mL. Estes valores foram inferiores aos obtidos para uma solução de nisina sem o gel de goma de guar, demonstrando a capacidade do biogel em aumentar e melhorar a atividade antimicrobiana deste péptido antimicrobiano (Cunha et al. 2018).

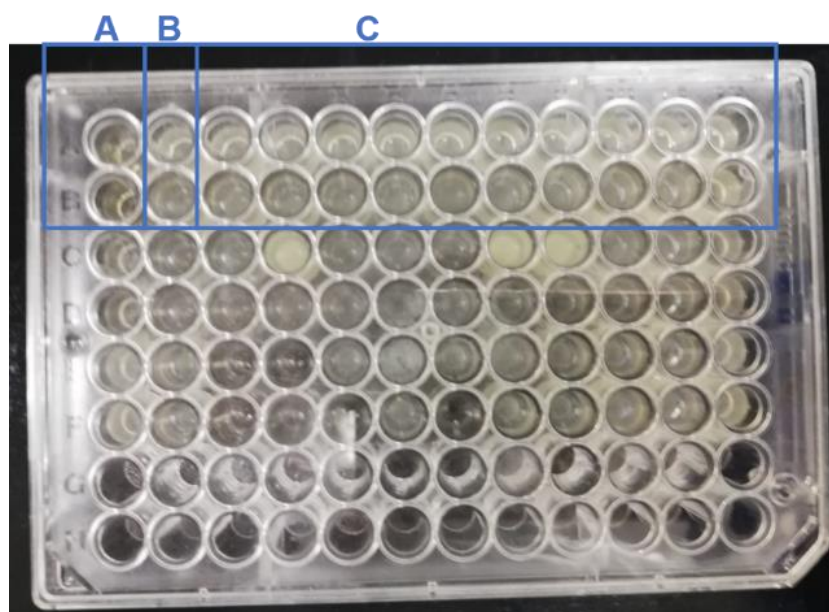
Neste protocolo, o biogel de nisina apresentou um valor de CMIB de 25µg/mL (figura 26) relativamente ao biofilme polimicrobiano, e um valor de CMEB superior a 100µg/mL (figura 27). Os resultados de CMEB foram, como seria de esperar, superiores aos de CMIB. Estes resultados confirmaram mais uma vez o potencial deste biogel antimicrobiano enquanto fórmula inovadora de administração tópica na cavidade oral durante o tratamento e prevenção da DP canina.





**Figura 26 - Determinação da CMIB (original do autor)**

Legenda: A – Controlo negativo; B – Controlo positivo; C – Poços onde não é visível multiplicação bacteriana; D – Poços onde é visível multiplicação bacteriana



**Figura 27 - Determinação da CMEB (original do autor)**

Legenda: A – Controlo negativo; B – Controlo positivo; C – Poços onde é visível multiplicação bacteriana

Independentemente dos valores obtidos durante a determinação da CMIB e da CMEB de um composto, estes devem ser sempre avaliados quanto ao seu risco de administração nas espécies-alvo.

Segundo a OMS, a Dose Diária Aceitável (DDA) representa a quantidade de uma substância que é possível consumir diariamente, durante toda a vida, sem apresentar risco para a saúde humana (World Health Organization 2008). O último relatório de segurança



realizado pelo FAO/OMS para a nisina a 7,5% m/m foi publicado em 2013 após a realização de ensaios de 13 semanas em murganhos, que permitiram definir a DDA da nisina como sendo de 0-2mg/kg p.v.. Estes valores foram obtidos depois da aplicação de um fator de segurança de 100, tendo em consideração a variabilidade intra e interespecífica, e atendendo à baixa probabilidade de exposição sistémica deste composto, já que a sua digestão ocorre ao nível intestinal por ação de enzimas pancreáticas (Tong et al. 2014; World Health Organization 2019a).

A goma de guar apresenta uma DDA classificada pela FAO/OMS em 1975 como “não especificada”, classificação aplicada a compostos que não apresentam risco de consumo para a saúde humana, apresentado toxicidade muito baixa (World Health Organization 2008; World Health Organization 2019b).

Para a avaliação da segurança de administração da fórmula de biogel de nisina utilizada neste projeto, foi considerado o valor obtido durante a determinação da CMIB, já que não foi possível calcular um valor preciso de CMEB, uma vez que este foi superior à maior concentração testada (100 µg/mL).

No caso das pastas dentífricas, a quantidade de composto a aplicar é normalmente representada em centímetros, variando de acordo com o peso do animal. Assim, partindo do pressuposto que este composto seria disponibilizado de forma muito idêntica às pastas dentífricas caninas, numa embalagem com uma abertura cilíndrica de 1cm de diâmetro, e considerando que se iria utilizar a posologia normalmente indicada para estas (variável de 1cm para cães com menos de 5kg a 5cm para cães com mais de 20kg), seria aplicado um intervalo de aproximadamente 1 a 4mL, tendo em conta a largura da abertura da embalagem e o tamanho das doses indicadas. Considerando o valor de CMIB de 25µg/mL, e o facto de a aplicação de 1ml de biogel num cão com menos de 5kg corresponder à administração de uma dose de 25µg de nisina e de a aplicação de 4ml de biogel num cão com mais de 20kg corresponder a uma dose de 100µg de nisina, ambas as doses a aplicar correspondem a 5µg/Kg, sendo inferior ao limite de DDA recomendado pela OMS.

Uma vez que os valores estabelecidos pela OMS se destinam à administração oral de nisina a humanos, a determinação da DDA específica para a espécie canina permitiria reduzir a variabilidade interespecífica e, assim, a obtenção de valores mais precisos para o estudo da aplicação deste biogel antimicrobiano para controlo da DP canina.

#### **4. Conclusões**

Um dos principais objetivos deste estudo foi o desenvolvimento *in vitro* de um modelo de biofilme polimicrobiano, capaz de ser reproduzível no futuro e que permitiu a avaliação da eficácia de um biogel de nisina.

Neste estudo, confirmou-se também que o gel de goma de guar é um veículo adequado para a administração de nisina, mesmo na presença de saliva. Este gel constitui um veículo de administração que tem revelado diversas vantagens, incluindo o aumento da capacidade antimicrobiana da nisina relativamente à inibição de biofilmes antimicrobianos compostos por bactérias presentes na cavidade oral canina.

O composto avaliado neste estudo constitui assim uma fórmula inovadora com grande potencial para o tratamento e prevenção da DP canina, sugerindo a necessidade de continuação desta linha de investigação no sentido da sua utilização futura em contexto clínico.

## **5. Limitações do estudo**

Apesar de terem sido cumpridos os objetivos inicialmente propostos e de se terem obtido resultados promissores, este estudo apresentou algumas limitações.

Não foi possível a identificação simultânea na mesma lâmina de hibridação das cinco espécies bacterianas presentes no biofilme devido aos constrangimentos da técnica relacionados com o facto de nem todas as sondas utilizadas possuírem a mesma temperatura de hibridação e de o microscópio de epifluorescência não possuir filtros suficientes para a avaliação simultânea de cinco fluorocromos diferentes.

O facto de este tema estar em crescente desenvolvimento e de não existirem ainda muitos estudos acerca da utilização da nisina em modelos de biofilmes de placa dentária canina dificultou a comparação dos resultados obtidos com outros estudos pré-existentes.

É importante referir, também, que as espécies bacterianas presentes na cavidade oral canina variam de animal para animal, dependendo do estilo de vida do mesmo, do tipo de ração, hábitos de higiene dentária, brinquedos disponíveis, entre outros fatores, o que dificulta o estabelecimento de um modelo de biofilme dentário canino de utilização universal.

## **6. Perspetivas futuras**

As perspetivas futuras deste trabalho passam pela aprovação deste composto enquanto fórmula terapêutica comercializável.

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA – European Medicines Agency), existem cinco passos fulcrais desde a pesquisa laboratorial de novas substâncias até à obtenção de autorização de comercialização das mesmas.

O primeiro passo refere-se à pesquisa e desenvolvimento de novos compostos. Nessa pesquisa são desenvolvidos ensaios *in vitro* de forma a investigar as principais características das substâncias e as suas vantagens enquanto potencial novo fármaco. De seguida, uma pequena percentagem das substâncias investigadas, que demonstraram resultados positivos nos ensaios *in vitro*, são propostas pelos investigadores para elaboração de ensaios clínicos

*in vivo*. Estes ensaios necessitam de aprovação pela autoridade nacional competente, neste caso a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).

Os seguintes passos envolvem a avaliação por parte da EMA, mais concretamente pelo “Committee for Medicinal Products for Veterinary Use”, do medicamento proposto com base nos ensaios clínicos, de forma a garantir que este cumpre os requisitos legais, a autorização por parte da Comissão Europeia e, finalmente a disponibilização no mercado. Um passo extra sugere a monitorização constante da segurança do medicamento aprovado (European Medicines Agency 2018).

Tendo em mente a possibilidade de utilização do biogel de nisina enquanto fórmula aprovada de prevenção e tratamento da DP, sugere-se a realização de outros ensaios *in vitro*, tais como a avaliação da citotoxicidade e de viabilidade do biogel após diferentes períodos e condições de armazenamento.

Finalmente será necessária a realização de ensaios *in vivo* em indivíduos da espécie canina previamente à proposta de aprovação por parte da Comissão Europeia enquanto fórmula terapêutica.

## Bibliografia

- Albuquerque C, Morinha F, Requicha J, Martins T, Dias I, Guedes-Pinto H, Bastos E, Viegas C. 2012. Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *Vet J.* 191(3):299–305. doi:10.1016/j.tvjl.2011.08.017.
- Alm EW, Oerther DB, Larsen N, Stahl DA, Raskin L. 1996. The oligonucleotide probe database. *Appl Environ Microbiol.* 62(10):3557–3559.
- American Veterinary Dental College. 1988. Nomenclature - Periodontal disease. [accessed 2019 Aug 19]. <https://www.avdc.org/Nomenclature/>.
- American Veterinary Dental College. 2019. Stages of Pet Periodontal Disease. [accessed 2019 Aug 22]. <http://avdc.org/AFD/five-stages-of-pet-periodontal-disease/>.
- Araújo CL, Alves J, Lima A, Dias L, Silva P, Marques J, Azevedo V, Silva A, Folador A. 2018. The Genus *Corynebacterium* in the Genomic Era. In: Enany S, editor. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria*. 1st ed. IntechOpen. p. 59–77.
- Bahamondez-Canas TF, Heersema LA, Smyth HDC. 2019. Current status of in vitro models and assays for susceptibility testing for wound biofilm infections. *Biomedicines.* 7(2):1–31. doi:10.3390/biomedicines7020034.
- Batoni G, Maisetta G, Esin S. 2016. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1858(5):1044–1060. doi:10.1016/j.bbamem.2015.10.013.
- Bellows J. 2004. Periodontal Equipment, Materials, and Techniques. In: Bellows J, editor. *Small Animal Dental Equipment, Materials and Techniques*. 1st ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. p. 263–296.
- Bellows J. 2019. Oral Examination and Diagnosis. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. *Wiggs's Veterinary Dentistry, Principles and Practice*. 2nd ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 25–40.
- Bellows J, Berg ML, Dennis S, Harvey R, Lobprise HB, Snyder CJ, Stone AES, Van de Wetering AG. 2019. 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 55(2):49–69. doi:10.5326/JAAHA-MS-6933.
- Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Harrison OB, Maiden MCJ. 2014. The Genus *Neisseria*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 881–900.
- Bernard K. 2012. The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *J Clin Microbiol.* 50(10):3152–3158. doi:10.1128/JCM.00796-12.
- Bernard KA, Funke G. 2015. *Corynebacterium*. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S, editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1st ed. Bergey's Manual Trust. p. 1–70.
- Breukink E, van Heusden HE, Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S, Heck AJR, de Kruijff B. 2003. Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. *J Biol Chem.* 278(22):19898–19903.

doi:10.1074/jbc.M301463200.

- Brito EHS, Fontenelle ROS, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. 2009. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet J.* 182(2):320–326. doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.001.
- Cheigh CI, Pyun YR. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol Lett.* 27(21):1641–1648. doi:10.1007/s10529-005-2721-x.
- Collins MD, Love DN, Karjalainen J, Kanervo A, Forsblom B, Willems A, Stubbs S, Sarkiala E, Baley GD, Wigney DI, et al. 1994. Phylogenetic Analysis of Members of the Genus *Porphyromonas* and Description of *Porphyromonas cangingivalis* sp. nov. and *Porphyromonas cansulci* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 44(4):674–679. doi:10.1099/00207713-44-4-674.
- da Costa PM, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Vet Microbiol.* 120(1–2):122–131. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.005.
- Cunha E, Tavares L, Veiga AS, Oliveira M. 2019. Fighting antimicrobial resistance: the biomedical use of the antimicrobial peptide nisin. In: Berhardt L V., editor. *Advances in medicine and biology*. Vol. 149. 1st ed. New York: Nova Science Publishers, Inc. p. 79–112.
- Cunha E, Trovão T, Pinheiro A, Nunes T, Santos R, Moreira Da Silva J, São Braz B, Tavares L, Veiga AS, Oliveira M. 2018. Potential of two delivery systems for nisin topical application to dental plaque biofilms in dogs. *BMC Vet Res.* 14(1):1–10. doi:10.1186/s12917-018-1692-9.
- Cunha E, Trovão T, Santos R, Santos JD, Silva JM, Braz BS, Viegas AS, Tavares L, Oliveira M. 2017. Canine periodontal disease and its systemic implications - a review. *Rev Port Ciências Veterinárias.* 112(601–602):12–22.
- Datta A, Stapleton F, Willcox MDP. 2017. Bacterial Coaggregation Among the Most Commonly Isolated Bacteria From Contact Lens Cases. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 58(1):50. doi:10.1167/iovs.16-20593.
- Davis IJ, Wallis C, Deusch O, Colyer A, Milella L, Loman N, Harris S. 2013. A Cross-Sectional Survey of Bacterial Species in Plaque from Client Owned Dogs with Healthy Gingiva, Gingivitis or Mild Periodontitis. Semple MG, editor. *PLoS One.* 8(12):e83158. doi:10.1371/journal.pone.0083158.
- Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, Buckley CMF, Davis IJ, Bennett M-L, Marshall-Jones Z V. 2012. The Canine Oral Microbiome. Ravel J, editor. *PLoS One.* 7(4):e36067. doi:10.1371/journal.pone.0036067.
- Draper LA, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2015. Lantibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79(2):171–191. doi:10.1128/MMBR.00051-14.
- Elliott DR. 2005. Canine oral biofilms: Cultural, molecular, and in vitro studies. Doctoral thesis, University College London.
- European Medicines Agency. 2018. From laboratory to patient: the journey of a medicine assessed by EMA.

- Ezaki T. 2009. Genus I. *Peptostreptococcus*. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. p. 1008–1009.
- Field D, Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2015. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered*. 6(4):187–192. doi:10.1080/21655979.2015.1049781.
- Fiorellini JP, Kim D, Chang Y-C. 2018. Anatomy, Structure, and Function of the Periodontium. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. *Newman and Carranza's Clinical Periodontology*. 13th ed. Philadelphia (PA): Elsevier. p. 19–49.
- Forrest LJ. 2013. The Cranial and Nasal Cavities: Canine and Feline. In: Thrall DE, editor. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. 6th ed. Philadelphia (PA): Elsevier - Health Sciences Division. p. 129.
- Funke G, Englert R, Frodl R, Bernard KA, Stenger S. 2010. *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog bite. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60(11):2544–2547. doi:10.1099/ijs.0.019927-0.
- Ganière JP, Escande F, André-Fontaine G, Larrat M, Filloneau C. 1995. Characterization of group EF-4 bacteria from the oral cavity of dogs. *Vet Microbiol*. 44(1):1–9. doi:10.1016/0378-1135(94)00110-I.
- Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. 2016. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 56(8):1262–1274. doi:10.1080/10408398.2013.763765.
- Gibson FC, Genco CA. 2006. The Genus *Porphyromonas*. In: *The Prokaryotes*. Vol. 7. New York, NY: Springer New York. p. 428–454.
- Gorr S-U, Abdolhosseini M. 2011. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 38(SUPPL. 11):126–141. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01664.x.
- Gorrel C. 2004a. Periodontal disease. In: Gorrel C, editor. *Veterinary dentistry for the general practitioner*. 1st ed. London, UK: Saunders. p. 87–110.
- Gorrel C. 2004b. Oral examination and recording. In: Gorrel C, editor. *Veterinary dentistry for the general practitioner*. 1st ed. London, UK: Saunders. p. 47–55.
- Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuipers OP, de Kruijff B, Breukink E. 2006. An Alternative Bactericidal Mechanism of Action for Lantibiotic Peptides That Target Lipid II. *Science* (80- ). 313(5793):1636–1637. doi:10.1126/science.1129818.
- Holcombe LJ, Patel N, Colyer A, Deusch O, O'Flynn C, Harris S. 2014. Early Canine Plaque Biofilms: Characterization of Key Bacterial Interactions Involved in Initial Colonization of Enamel. Al-Ahmad A, editor. *PLoS One*. 9(12):e113744. doi:10.1371/journal.pone.0113744.
- Howell TH, Fiorellini JP, Blackburn P, Projan SJ, Harpe J, Williams RC. 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 20(5):335–339. doi:10.1111/j.1600-051X.1993.tb00369.x.
- Huang R, Li M, Gregory RL. 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*. 2(5):435–444. doi:10.4161/viru.2.5.16140.

- Johnson IH, Hayday H, Colman G. 1978. The Effects of Nisin on the Microbial Flora of the Dental Plaque of Monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Appl Bacteriol.* 45(1):99–109. doi:10.1111/j.1365-2672.1978.tb04203.x.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. Trato digestivo. In: Junqueira LC, Carneiro C, editors. *Histologia Básica*. 2nd ed. Rio de Janeiro (RJ): Nova guanabara. p. 279–310.
- Kačirová J, Maďar M, Štrkolcová G, Maďari A, Nemcová R. 2019. Dental Biofilm as Etiological Agent of Canine Periodontal Disease. In: Dincer S, editor. *Bacterial Biofilms*. 1st ed. IntechOpen.
- Kampmeier R. 1978. Identification of the *Gonococcus* by Albert Neisser. *Sex Transm Dis.* 5(2):71–72.
- Katharios-Lanwermeyer S, Xi C, Jakubovics NS, Rickard AH. 2014. Mini-review: Microbial coaggregation: ubiquity and implications for biofilm development. *Biofouling.* 30(10):1235–1251. doi:10.1080/08927014.2014.976206.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine.* 22(7):822–830. doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.027.
- Kramer NE, Smid EJ, Kok J, De Kruijff B, Kuipers OP, Breukink E. 2004. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by Lipid II levels. *FEMS Microbiol Lett.* 239(1):157–161. doi:10.1016/j.femsle.2004.08.033.
- Lawson PA, Johnson CN, Bengtsson L, Charalampakis G, Dahlén G, Moore E, Falsen E. 2012. Anaerobe *Peptostreptococcus canis* sp. nov., isolated from subgingival plaque from canine oral cavity. *Anaerobe.* 18(6):597–601. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.10.008.
- Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. 2013. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 2(2):288–356. doi:10.3390/pathogens2020288.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug.* 1st ed. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. p. 5–63.
- Lemmons M, Beebe D. 2019. Oral Anatomy and Physiology. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. *Wiggs's Veterinary Dentistry, Principles and Practice*. 2nd ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 1–24.
- Liu G, Tang CM, Exley RM. 2015. Non-pathogenic Neisseria: members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology.* 161(7):1297–1312. doi:10.1099/mic.0.000086.
- Lobprise HB, Stepianiuk K. 2019. Oral Surgery – Periodontal Surgery. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. *Wiggs's Veterinary Dentistry, Principles and Practice*. 2nd ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 193–228.
- López D, Vlamakis H, Kolter R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:1–11.
- Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP. 2018. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clin Microbiol Rev.* 31(3):1–49.

doi:10.1128/CMR.00084-16.

- Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. 2016. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci.* 113(6):E791–E800. doi:10.1073/pnas.1522149113.
- McFadden T, Marretta SM. 2013. Consequences of Untreated Periodontal Disease in Dogs and Cats. *J Vet Dent.* 30(4):266–275. doi:10.1177/089875641303000413.
- Miguel Carreira L, Daniela D, Pedro A. 2015. Serum Ionized Calcium Quantification for Staging Canine Periodontal Disease: A Preliminary Study. *Top Companion Anim Med.* 30(2):48–50. doi:10.1053/j.tcam.2015.07.002.
- Niemiec BA. 2008. Periodontal Therapy. *Top Companion Anim Med.* 23(2):81–90. doi:10.1053/j.tcam.2008.02.004.
- Niemiec BA. 2011. Periodontal Disease. Kinane DF, Mombelli A, editors. *Top Companion Anim Med.* 15(2):57–114. doi:10.1159/isbn.978-3-8055-9834-7.
- Niemiec BA. 2012a. Gingival surgery. In: Niemiec BA, editor. *Veterinary Periodontology*. 1st ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc., p. 193–205.
- Niemiec BA. 2012b. Periodontal flap surgery. In: Niemiec BA, editor. *Veterinary Periodontology*. 1st ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc., p. 206–248.
- Niemiec BA, Gawor J, Nemec A, Clarke D, Tutt C, Gioso M, Stegall P, Chandler M, Morgenegg G, Jouppi R, et al. 2018. World Small Animal Veterinary Association Global Dental Guidelines. [accessed 2019 Nov 15]. <https://www.wsava.org/Guidelines/Global-Dental-Guidelines>.
- O’Flynn C, Deusch O, Darling AE, Eisen JA, Wallis C, Davis IJ, Harris SJ. 2015. Comparative genomics of the genus *Porphyromonas* identifies adaptations for heme synthesis within the prevalent canine oral species *Porphyromonas gingivalis*. *Genome Biol Evol.* 7(12):3397–3413. doi:10.1093/gbe/evv220.
- Oliveira M. 2005. Detecção de bactérias patogénicas em alimentos por Hibridação *In Situ* Fluorescente. Universidade Técnica de Lisboa.
- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118(1–2):133–140. doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.008.
- Oliveira M, Blasco L, Ferrer S, Bernardo F. 2004. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in milk by Fluorescent *In Situ* Hybridisation. *Rev Port Ciências Veterinárias.* 99(552):211–214.
- Oliveira M, Tavares M, Gomes D, Touret T, São Braz B, Tavares L, Semedo-Lemsaddek T. 2016. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 46(May 2018):27–31. doi:10.1016/j.cimid.2016.04.002.
- Papadimitriou SA, Kouki MI, Papadopoulou I, Slini T, Sakel-Lari D. 2016. Detection and Quantification of Subgingival Plaque Bacteria in Beagle Dogs. *J Vet Sci Anim Welf.* 1(1):1–5.



- Patel N, Colyer A, Harris S, Holcombe L, Andrew P. 2017. The Prevalence of Canine Oral Protozoa and Their Association with Periodontal Disease. *J Eukaryot Microbiol.* 64(3):286–292. doi:10.1111/jeu.12359.
- Pieri FA, Silva V de O, Junior AS, Moreira MAS. 2018. Cultivable Microbiota in Mitis Salivarius Agar from Dental Plaque of Dogs. *Anim Vet Sci.* 6(2):21. doi:10.11648/j.av.s.20180602.11.
- Polkowska I, Sobczyńska-rak A, Golyńska M. 2014. Analysis of gingival pocket microflora and biochemical blood parameters in dogs suffering from periodontal disease. *In Vivo (Brooklyn).* 28(6):1085–1090.
- Pratten, Wills, Barnett, Wilson. 1998. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J Appl Microbiol.* 84(6):1149–1155. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00462.x.
- Reddy K, Mohan GK, Satla S, Gaikwad S. 2011. Natural polysaccharides: Versatile excipients for controlled drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* 6(6):275–286.
- Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11(2):94–100. doi:10.1016/S0966-842X(02)00034-3.
- Rogers LA, Whittier EO. 1928. Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *J Bacteriol.* 16(4):211–29.
- Roudebush P, Logan E, Hale FA. 2005. Evidence-Based Veterinary Dentistry: A Systematic Review of Homecare for Prevention of Periodontal Disease in Dogs and Cats. *J Vet Dent.* 22(1):6–15. doi:10.1177/089875640502200101.
- Saha HN, Collins MD. 1988. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 38(1):128–131. doi:10.1099/00207713-38-1-128.
- Sanguanserm Sri P, Nobbs AH, Jenkinson HF, Surarit R. 2018. Interspecies dynamics among bacteria associated with canine periodontal disease. *Mol Oral Microbiol.* 33(1):59–67. doi:10.1111/omi.12199.
- Santin R, Souza Mattei A, Bressan Waller S, Martins Madrid I, Cleff MB, Orzechowski Xavier M, Nobre M de O, Nascente P da S, Braga de Mello JR, Meireles MCA. 2013. Clinical and mycological analysis of dog's oral cavity. *Brazilian J Microbiol.* 44(1):139–143. doi:10.1590/S1517-83822013005000018.
- Santos JD. 2018. Relação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas bacterianas no cão : um estudo retrospectivo. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa.
- Santos R, Gomes D, Macedo H, Barros D, Tibério C, Veiga AS, Tavares L, Castanho M, Oliveira M. 2016. Guar gum as a new antimicrobial peptide delivery system against diabetic foot ulcers *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol.* 65(10):1092–1099. doi:10.1099/jmm.0.000329.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 34(1):31–34. doi:10.1099/00207713-34-1-31.

- Semedo-Lemsaddek T, Tavares M, São Braz B, Tavares L, Oliveira M. 2016. Enterococcal Infective Endocarditis following Periodontal Disease in Dogs. Schlievert PM, editor. PLoS One. 11(1):e0146860. doi:10.1371/journal.pone.0146860.
- Sherry L, Lappin G, O'Donnell LE, Millhouse E, Millington OR, Bradshaw DJ, Axe AS, Williams C, Nile CJ, Ramage G. 2016. Viable compositional analysis of an eleven species oral polymicrobial biofilm. Front Microbiol. 7(JUN):1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00912.
- Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. 2015. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. Front Microbiol. 6(JUN):1–14. doi:10.3389/fmicb.2015.00617.
- Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. 2016. Biomedical applications of nisin. J Appl Microbiol. 120(6):1449–1465. doi:10.1111/jam.13033.
- Soares GMS, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, Teles R. 2015. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. Antimicrob Agents Chemother. 59(5):2791–2798. doi:10.1128/AAC.04974-14.
- Song Y, Liu C, McTeague M, Vu A, Liu JY, Finegold SM. 2003. Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus *Peptostreptococcus* by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers. Microbiology. 149(7):1719–1727. doi:10.1099/mic.0.26227-0.
- Soukup J. 2010. Periodontitis. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7th ed. Philadelphia (PA): Elsevier - Health Sciences Division. p. 179–184.
- Stepaniuk K. 2019. Periodontology. In: Lobprise HB, Dodd JR (Bert), editors. Wiggs's Veterinary Dentistry. 2nd ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 81–108.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annu Rev Microbiol. 56(1):187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Stempel N, Strehmel J, Overhage J. 2014. Potential Application of Antimicrobial Peptides in the Treatment of Bacterial Biofilm Infections. Curr Pharm Des. 21(1):67–84. doi:10.2174/1381612820666140905124312.
- Sturgeon A, Stull JW, Costa MC, Weese JS. 2013. Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. Vet Microbiol. 162(2–4):891–898. doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.018.
- Subbarao K, Nattuthurai G, Sundararajan S, Sujith I, Joseph J, Syedshah Y. 2019. Gingival crevicular fluid: An overview. J Pharm Bioallied Sci. 11(6):135. doi:10.4103/JPBS.JPBS\_56\_19.
- Sugawara E, Nikaido H. 2014. Bacteriocins - Nisin. Russell NJ, Gould GW, editors. Antimicrob Agents Chemother. 58(12):7250–7257. doi:10.1128/AAC.03728-14.
- Summanen P, Finegold SM. 2015. Porphyromonas. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S, editors. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Bergey's Manual Trust. p. 1–14.

- Sun Z, Zhong J, Liang X, Liu J, Chen X, Huan L. 2009. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(5):1964–1973. doi:10.1128/AAC.01382-08.
- Svec P, Devriese LA. 2009. Genus I. *Enterococcus*. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. p. 594–607.
- Tatum HW, Ewing WH, Weaver RE. 1974. Miscellaneous Gram-negative bacteria. In: Lenette EH, Spaulding EH, Truant JP, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd ed. Washington: Washington. p. 270–294.
- Teughels W, Laleman I, Quirynen M, Jakubovics N. 2018. Biofilm and Periodontal Microbiology. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA, editors. *Newman and Carranza's Clinical Periodontology*. 13th ed. Philadelphia (PA): Elsevier. p. 112–150.
- Thiercelin ME, Jouhaud L. 1899. Sur un diplococque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *R Soc Biol*. 5:269–271.
- Thombare N, Jha U, Mishra S, Siddiqui MZ. 2016. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *Int J Biol Macromol*. 88:361–372. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001.
- Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. 2010. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides*. 31(11):2003–2008. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.016.
- Tong Z, Ni L, Ling J. 2014. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*. 60:32–40. doi:10.1016/j.peptides.2014.07.020.
- Tremblay YDN, Caron V, Blondeau A, Messier S, Jacques M. 2014. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol*. 172(3–4):511–518. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.007.
- Trovão T. 2017. Eficácia in vitro de dois veículos de administração tópica de nisina a *Enterococci* isolados de cães com doença periodontal. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa.
- Vandamme P, Holmes B, Bercovier H, Coenye T. 2006. Classification of Centers for Disease Control Group Eugonic Fermenter (EF)-4a and EF-4b as *Neisseria animaloris* sp. nov. and *Neisseria zoodegmatis* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56(8):1801–1805. doi:10.1099/ijs.0.64142-0.
- Vandeplassche E, Coenye T, Crabbé A. 2017. Developing selective media for quantification of multispecies biofilms following antibiotic treatment. *Torrents E*, editor. *PLoS One*. 12(11):e0187540. doi:10.1371/journal.pone.0187540.
- Walcher M, Skvoretz R, Montgomery-Fullerton M, Jonas V, Brentano S. 2013. Description of an Unusual *Neisseria meningitidis* Isolate Containing and Expressing *Neisseria gonorrhoeae*-Specific 16S rRNA Gene Sequences. *J Clin Microbiol*. 51(10):3199–3206. doi:10.1128/JCM.00309-13.
- Wallis C, Marshall M, Colyer A, O'Flynn C, Deusch O, Harris S. 2015. A longitudinal

- assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Vet Microbiol.* 181(3–4):271–282. doi:10.1016/j.vetmic.2015.09.003.
- Wang Z, de la Fuente-Núñez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock REW. 2015. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. Wen Z, editor. *PLoS One.* 10(7):e0132512. doi:10.1371/journal.pone.0132512.
- Willey JM, Sherwood LW, Woolverton CJ. 2008a. Microbial Growth. In: Willey JM, Sherwood LW, Woolverton CJ, editors. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology.* 7th ed. New York: McGraw Hill Higher Education. p. 119–148.
- Willey JM, Sherwood LW, Woolverton CJ. 2008b. Bacteria: The Low G+C Gram Positives. In: Willey JM, Sherwood LW, Woolverton CJ, editors. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology.* 7th ed. New York: McGraw Hill Higher Education. p. 571–588.
- World Health Organization. 2008. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food.
- World Health Organization. 2019a. Nisin. Eval Jt FAO/WHO Expert Comm Food Addit. [accessed 2020 Jan 20]. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=572#>.
- World Health Organization. 2019b. Guar gum. Eval Jt FAO/WHO Expert Comm Food Addit. [accessed 2020 Jan 20]. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=863>.
- Zendo T, Yoneyama F, Sonomoto K. 2010. Lactococcal membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88(1):1–9. doi:10.1007/s00253-010-2764-3.
- Zetner K, Rothmueller G. 2002. Treatment of periodontal pockets with doxycycline in beagles. *Vet Ther.* 3(4):441–52.

## Anexos

**Anexo 1** - Resumo do poster: “A five-species biofilm model for confirming the potencial of a nisin-biogel aiming at canine periodontal disease control”:

### **A five-species biofilm model for confirming the potencial of a nisin-biogel aiming at canine periodontal disease control**

**Eva Cunha<sup>1</sup>, Sandra Rebelo<sup>1</sup>, Luis Tavares<sup>1</sup>, Luís Miguel Carreira<sup>1</sup>, Manuela Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal.

**Background:** Periodontal disease (PD) is one of the most common disease in dogs, affecting around 80% of the population. It is caused by the development of a polymicrobial biofilm in the tooth surface and exacerbated by the host inflammatory response. Previous studies have showed that, when incorporated with a guar-gum biogel (nisin-biogel), nisin can inhibit and eradicate canine oral enterococcal-biofilms. This makes nisin a potential agent for PD control. This project aimed: to measure coaggregation between bacterial strains, previously showed to be present on different stages of PD; then to develop an *in vitro* polymicrobial biofilm, composed by these strains; and to evaluate nisin-biogel inhibitory activity against the polymicrobial biofilm, by determining the Minimum Biofilm Inhibitory (MBIC) and Eradication Concentrations (MBEC).

**Materials/methods:** Our bacterial collection was composed by five strains: *Neisseria zoodegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium canis*, *Porphyromonas cangingivalis* and *Peptostreptococcus canis*, originated from the canine oral cavity. Nisin-biogel was prepared as described in previous reports[1]. For the coaggregation protocol all strains were grown in Brucella Medium, supplemented with hemin and vitamin K, harvest by centrifugation and mixed in equal proportions with coaggregation buffer. Optical density was measured after 0, 2 and 24 hours and coaggregation was calculated using a formula present in previous studies[2]. To evaluate the influence of the nisin-biogel, polymicrobial biofilms were grown in microplates for, 48 hours at 37°C; and tested by Fluorescent *in vitro* Hybridization (FISH) for bacterial identification. Later, nisin-biogel was added at different concentrations, and MBIC and MBEC were determined by measure of the optical density 600nm.

**Results:** All bacterial pairs exhibited a percentage of coaggregation greater than 30% at 24 hours. Only 33% of the bacterial pairs showed coaggregation at 2 hours. FISH showed the presence of the five bacterial strains on the biofilm model. Nisin-biogel MBIC value obtained against the polymicrobial biofilm was 25 µg/mL, while MBEC value was higher than 100 µg/mL.

**Conclusions:** It was possible to develop an *in vitro* model of a periodontal polymicrobial biofilm, composed by five strains. Nisin-biogel was effective in the inhibition of the biofilm, reinforcing the potential of this product in canine PD control.

**Acknowledgements:** This work was supported by CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa

(Project UID/CVT/00276/2019). Eva Cunha acknowledges the Foundation for Science and Technology for her PhD fellowship (SFRH/BD/131384/2017).

[1] Cunha E, et al. (2018). Potential of two delivery systems for nisin topical application to dental plaque biofilms in dogs. *BMC Veterinary Research* 14(1): 375.

[2] Datta A, Stapleton F, Willcox MDP. Bacterial coaggregation among the most commonly isolated bacteria from contact lens cases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:50–58. DOI: 10.1167/iovs.16-20593